

Untersuchung des Einflusses der Matrix und photoprotektiver Additive auf die Eigenschaften von Fluorophoren mittels Einzelmolekülspektroskopie

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Denis Dörr

Geb. in Tomsk

Düsseldorf, Mai 2014

aus dem Institut für physikalische Chemie II
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Claus A. M. Seidel
Korreferent: Prof. Dr. Peter Gilch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

Summary

Due to its easy detectability fluorescence is widely used in spectroscopy to investigate a variety of chemical and biochemical samples. The characteristics of fluorescence like intensity, lifetime, anisotropy and quantum yield contain information about electronic structure, mobility and orientation of fluorophores and they depend on the fluorophores environment. This interaction was used to characterize the environment as well as to tune the fluorophores.

The first goal of this work was to investigate the feasibility of fluorescence-based local force probes for polymers under tension, using the fluorescence signal of an oligoparaphenylenevinylene derivative (*OPV 5*) with a twisted molecular backbone. Improved optical sensors of this type should in principle be able to monitor local mechanical stress in transparent samples down to the single molecule level, which harbors promising applications in polymer and nano science and technology. To investigate correlations between the impact of an external mechanical force on the molecular framework of fluorophores and the resultant changes of their fluorescence properties *OPV5* was used to dope thin foils made of *PVC*. The foils were stretched by applying uniaxial force and three major optical effects were observed simultaneously. First, the fluorescence anisotropy increased, which indicates a reorientation of the fluorophores within the matrix. Second, the fluorescence lifetime decreased by approximately 2.5 % (25 ps). Finally, an increase of the emission energy of about 0.2% (corresponding to a blue-shift of 1.2 nm) was observed. In addition, analogous measurements with *Rhodamine 123* as an inert reference dye showed only minor effects which can be attributed to matrix effects due to refractive index changes. To relate the observed spectroscopic changes to the underlying changes in molecular properties, the measured optical effects were compared to quantum-chemical calculations. Both, the observed blue-shift of fluorescence and the reduced lifetime of *OPV5* under tensile stress are consistent with the results of the semiempirical calculations.

The accuracy of a fluorescence signal is limited by the number of detected photons, hence it is important to investigate and extend the fluorescence photon emission capabilities of fluorophores. Therefore the second goal of this work was to optimize

the fluorescence signal of a fluorophore. In this context, three different additives which enhance the fluorescence signal were investigated as selective quenchers for triplet or radical states of *Rhodamine 110* (*Rh 110*):

- 1) mainly triplet state quencher 4-(phenylazo)-benzoic acid (*AZB-C*)
- 2) the triplet and radical cation state quencher 4-(phenylazo)anilin-benzoic acid (*A-AZB-C*)
- 3) the strong antioxidant 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (*Trolox*).

Fluorescence correlation spectroscopy (*FCS*) in combination with power plot analysis was used to describe the entire fluorescence output according to a derived kinetics model for excitation and fluorescence of *Rh 110*.

Under air saturated conditions the triplet and radical cation states were observed as dark states of *Rh 110*, where the radical cation state was the major populated state. Hence the application of quencher *A-AZB-C* which effectively prevented the triplet and radical formation even at high excitation irradiance led to strongest enhancement of the fluorescence signal. At an excitation irradiance of 1 MW/cm² and 600 μM *A-AZB-C* a tenfold increase of the fluorescence countrate to approximately 2.4 MHz was observed. The application of the mainly triplet quenching *AZB-C* led to a significantly smaller enhancement of the fluorescence signal. At the same excitation irradiance of 1 MW/cm² and a concentration of 800 μM only a six times increased fluorescence countrate was observed.

In case of application of the strong antioxidant *Trolox* the formation of an additional dark state, the radical anion state, was observed. Hence the enhancement of fluorescence signal with *Trolox* alone was similar to *AZB-C*. It was possible to quench effectively the radical anion state observed in the presence of *Trolox* with *AZB-C*. Consequently the enhancement of fluorescence signal in the presence of a mixture between *Trolox* and *AZB-C* was similar like with *A-AZB-C* alone.

Additionally the photo destruction reaction of Rhodamine 123 (*Rh 123*) and the impact of the additives *A-AZB-C* and *AZB-C* on the photo stability of *Rh 123* were investigated. It was found that the main pathway for the photo destruction reaction of *Rh 123* in the presence of oxygen proceeds via the first excited singlet state of *Rh 123*. For this reason the investigated additives had only weak influence on the

photo stability of *Rh 123* in the presence of oxygen. Under deoxygenated conditions the photo stability of *Rh 123* was increased by a factor of ten if the additive *A-AZB-C* or *AZB-C* with concentrations of 100 μM were added to the dye solution.

Especially in single molecule detection (*SMD*) techniques with short dwell times of the fluorophores in the confocal volume, where only small numbers of fluorescence photons can be collected from each fluorophore, the enhancement of the fluorescence signal can significantly improve the measurements. Short dwell times can be also a result of directed flow. Therefore the third goal of this work was the application of additives for compensation of fluorescence photon loss under flow conditions. In this context, the fluorescence signals from *Rh 123* and *Rh 110* at flow conditions were investigated, using a combination of a single molecules detection fluorescence setup with a microfabricated diffusive mixer (micromixer). The quantitative analysis of *SMD* measurements in the micromixer requires the characterization of the flowpattern. One approach for calculating the flow in microchannels is Computational Fluid Dynamics (*CFD*). Here the fabrication precision of microchannels in general limits the accuracy of numerical calculations. At the same time *FCS* as experimental approach can probe the flow velocity in microchannels directly. However the characterization of flow pattern by *FCS* is limited by photon statistics and positioning accuracy of the confocal volume in the microchannels. At the same time the characterization of the flow pattern by *FCS* demands many single *FCS* measurements. Using the complementary combination of *CFD* with *FCS* it was possible to overcome most of the limitations of both methods. Thus a small number of *FCS* measurements provided necessary information for accurate numerical calculation of the flow pattern. Vice versa the knowledge of the flow pattern in combination with *FCS* provided the accurate position of the confocal volume inside of a microchannel. Moreover using the calculated flow velocity for calibration of the confocal volume in single focus *FCS* measurements it was possible to estimate the precise value for the diffusion coefficient of *Rh 110*

The time resolution of the micromixer is set by the time required for diffusively mixing and the dwell time needed to collect a given number of photons. In fact, the flow induced photon loss limited the maximum flow velocity for *SMD* measurements to 4 $\mu\text{m/ms}$, which degraded the maximum time resolution of the used micromixer

from 1.8 ms to 3 ms. One approach to collect enough fluorescence photons at high flow is to increase the excitation intensity, however this alone is unsatisfactory since it increases the probability to populate long lived triplet and radical states. The application of the dark state quencher *A-AZB-C* with 400 μM concentration in combination with a high excitation irradiance of 170 kW/cm^2 *SMD* measurements of *Rh 123* improved the fluorescence signal by a factor of four. Thereby the flow induced photon loss was compensated, so that the time resolution of the micromixer was finally limited only by the time required for diffusively mixing.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Theoretische Grundlagen	4
1.1 <i>Absorption und Emission von Strahlung bei organischen Chromophoren.....</i>	4
1.1.1 Absorption von Licht	4
1.1.2 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer	6
1.1.3 Relaxation eines angeregten Moleküls unter Beteiligung eines anderen Moleküls	8
1.1.3.1 Relaxation eines angeregten Farbstoffes über Energietransfer	9
1.1.3.2 Relaxation eines angeregten Farbstoffes über einen Elektronentransfer	11
1.1.4 Fluoreszenzanisotropie	12
1.1.5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	15
1.2 <i>Photozerstörung</i>	17
1.2.1 Geschwindigkeit der Photozerstörung.....	17
1.2.2 Quantenausbeute der Photozerstörung	18
2 Allgemeine Methoden.....	20
2.1 <i>Absorptionsspektroskopie</i>	20
2.2 <i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	20
2.3 <i>Fluoreszenzmessungen am Einzelmolekülfluoreszenzaufbau.....</i>	20
2.4 <i>Selektion eines Einzelmolekülfluoreszenzereignisses bei MFD-Messungen.....</i>	22
2.4.1 Durchmesser der Anregungs- und der Detektionsvolumina zusammen mit Leistungsdichten bei FCS- und Einzelmolekül-Messungen.....	25
2.4.1.1 Die mittlere Leistungsdichte bzw. mittlere Leistung eines Laserstrahls mit gaußförmigen Intensitätsprofil.....	25
2.4.1.2 Die mittlere Leistungsdichte bzw. mittlere Leistung der Fluoreszenz bei einem gaußförmigem Intensitätsprofil des Laserstrahls und bei gleichzeitiger Verwendung einer Lochblende 27	
2.4.2 Einfluss der langlebigen elektronischen Zustände auf die Fluoreszenzintensität	30
3 Experimente und Auswertung.....	34
3.1 <i>OPV als Molekulare Kraftsensoren</i>	34
3.1.1 Vorwort	34
3.1.2 Einleitung	35
3.1.3 Methoden	37
3.1.3.1 Kombinierte Folien-Zugexperimente (Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 1)	37
3.1.3.2 Herstellung von PVC-Folien für PVC-Untergrundmessungen	37
3.1.3.3 Herstellung von PVC-Folien für Folienzugexperimente.....	37
3.1.3.4 Reduzierung des Fluoreszenzhintergrunds der Folien	38
3.1.3.5 Umrechnung der Zugkraft in Zugspannung bei PVC-Folien.....	39
3.1.3.6 Viskoelastizität einer PVC-Folie	40
3.1.4 Ergebnisse	44
3.1.4.1 Spektroskopische Charakterisierung von OPV 5	44
3.1.4.2 Folienzug- und Fluoreszenzmessungen	44
3.1.5 Diskussion der Ergebnisse.....	48
3.1.5.1 OPV 5-Excimere in PVC-Folien.....	48
3.1.5.2 Vergleich der Reversibilität der Änderung der Fluoreszenzanisotropie zur Reversibilität der Änderung der Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzemission.....	48
3.1.5.3 Fluoreszenzanisotropie	50

3.1.5.4	Änderung der Fluoreszenzlebensdauer und der Blauverschiebung der Fluoreszenzemission des OPV 5	52
3.2	<i>Additive zur Steigerung der Signalstärke von Rhodamin 110</i>	53
3.2.1	Vorwort	53
3.2.2	Einleitung	54
3.2.2.1	Das elektronische Zustandsmodell von Rh 110	54
3.2.2.2	Der Einfluss der Additive auf die elektronischen Zustände des Rh 110	58
3.2.2.3	Übersicht der verwendeten Grundmodelle	60
3.2.3	Materialien und Methoden.....	63
3.2.3.1	Fluoreszenzquantenausbeute von Rh 110	63
3.2.3.2	Bestimmung von k_F und k_{IC} des Rh 110	63
3.2.3.3	Anregungsraten und Absorptionsquerschnitte elektronischer Übergänge von Rh 123 (und Rh 110)	63
3.2.3.4	Untergrundzählrate der verwendeten Additive	64
3.2.3.5	Thermodynamisch erlaubte Redoxreaktionen zwischen Rh 110 und den Additiven	66
3.2.3.6	Singulettlöschung durch die verwendeten Additive	68
3.2.3.7	FCS-Fluoreszenzaufbau für Fluoreszenzmessungen mit Triplett- und Radikal-Löcher (FCS-Fluoreszenzaufbau 1)	68
3.2.3.8	Probenkammern für FCS-Messungen.....	69
3.2.3.9	Aufnahme der FCS-Daten	70
3.2.3.10	Korrektur der F_{cpm} (FCS) bei FCS-Messungen mit hoher Untergrundzählrate.....	70
3.2.3.11	Bestimmung der Detektionseffizienz	71
3.2.3.12	Aufnahme des Fluoreszenzsignals.....	72
3.2.3.13	Bestimmung des Fluoreszenzsignals eines Fluorophors aus FCS-Messungen.....	72
3.2.3.14	Bestimmung der Fluoreszenzzählrate F_{cpm} (ideal).....	73
3.2.3.15	Anpassung des Fluoreszenzsignals am FCS-Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) bei Verwendung von Emissionsfiltern	75
3.2.3.16	Fluoreszenzaufbau für Messungen der Photozerstörung (Fluoreszenzaufbau für Photozerstörung).....	75
3.2.3.17	Messungen der Photozerstörung	76
3.2.3.18	Küvetten für Messungen unter sauerstofffreien Bedingungen.....	77
3.2.3.19	Adsorption und Desorption der Farbstoffe an der Küvettenwand	77
3.2.3.20	Abnahme der Intensität aufgrund der Lichtabsorption in einer Küvette	78
3.2.4	Auswertung der FCS-Messungen von Rh110 ohne Additive und in Gegenwart von AZB-C	79
3.2.4.1	Darstellung der Modelle und Modellfunktionen	79
3.2.4.2	Bestimmung von k_{ISC} , k_T und k_{qT} mittels Auswertung des Triplettterms der Fluoreszenzkorrelationskurven.	92
3.2.4.3	Bestimmung der Radikalkationparameter aus FCS-Messungen von Rh 110 ohne Additive und in Gegenwart von AZB-C	94
	Diskussion der Ergebnisse der Auswertung mittels Radikalkation-Targetfits der FCS-Messungen von Rh 110 ohne Additive und in Gegenwart von AZB-	97
3.2.5	Fluoreszenzsignal bei Messungen mit einer konfokalen Messanordnung	102
3.2.5.1	Darstellung des Modells	102
3.2.5.2	Das gesamte Fluoreszenzsignal	103
3.2.5.3	Die Fluoreszenzzählrate pro Molekül	107
	Diskussion der Ergebnisse der Auswertung der Fluoreszenzzählrate	112
3.2.6	Auswertung der FCS-Messungen von Rh110 in Gegenwart von Trolox	115
3.2.6.1	Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der elektronischen Zustände von Rh 110 unter Berücksichtigung von Radikalanionzuständen	115
3.2.6.2	Auswertung der summierten Amplituden der Terme aller Dunkelzustände des Rh 110 in Gegenwart von Trolox	121

3.2.6.3	Verwendung des Radikalkation-Targetfits für FCS-Messungen von Rh110 in Gegenwart einer Trolox/AZB-C-Mischung für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{oxSL} , k_{qR^+}	126
3.2.7	Auswertung der Amplituden der Dunkelzustände von Rh 110 in Gegenwart von A-AZB-C unter Einbeziehung des Radikalanionzustands	131
3.2.7.1	Auswertung unter der Annahme einer vernachlässigbaren Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalanionzustands	132
3.2.7.2	Auswertung unter der Annahme einer nicht vernachlässigbaren Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalanionzustands	134
3.2.8	Abschließende Diskussion für die Anwendung der Additive zur Fluoreszenzsignalsteigerung des Rh 110	136
3.2.8.1	Zusammenfassung der ermittelten kinetischen Parameter des Rh 110 mit und ohne Additive	136
3.2.8.2	Die Besetzung der elektronischen Zustände und der daraus resultierenden Fluoreszenzzählrate des Rh 110 in Gegenwart der Additive	137
3.2.8.3	Das Verhältnis der Untergrundzählrate zur Fluoreszenzzählrate bei Verwendung der Additive	145
3.2.8.4	Die Strategie zur Optimierung der Fluoreszenzzählrate	149
3.2.9	Auswertung der Messungen der Photozerstörung von Rhodamin 123	152
3.2.9.1	Das kinetische Modell der Photozerstörung bei niedrigen Leistungsdichten ...	152
3.2.9.2	Photozerstörung von Rh 123 in Gegenwart von Sauerstoff	155
3.2.9.3	Messungen der Photozerstörung unter sauerstofffreien Bedingungen	156
3.2.9.4	Diskussion der Ergebnisse	159
3.2.9.5	Der Einfluss der Photozerstörung auf die Fluoreszenzmessungen	161
3.3	<i>Mikrofluidischer Mixer</i>	164
3.3.1	Vorwort	164
3.3.2	Einleitung	165
3.3.3	Methoden	171
3.3.3.1	Herstellung des Mikromixers	171
3.3.3.2	Strömung einer inkompressiblen Flüssigkeit in rechteckigen Kanälen	172
3.3.3.3	Analogie zum Ohm'schen Gesetz	175
3.3.3.4	Numerische Strömungssimulationen	177
3.3.3.5	Fluoreszenzmessungen im mikrofluidischen Mixer (Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 2)	183
3.3.3.6	Position des konfokalen Volumens im Detektionskanal	184
3.3.3.7	Einfachere Konstruktion für die Einzelmolekülmessungen (MFD) unter Flussbedingungen (siehe Kapitel 3.3.4.2)	184
3.3.3.8	Die Messungen der Flussgeschwindigkeit im Mikromixer mittels FCS	186
3.3.4	Ergebnisse	188
3.3.4.1	Die Charakterisierung der Flussprofile und der Transporteigenschaften der Fluorophore mittels einer Kombination aus FCS-Messungen und CFD-Simulationen	188
3.3.4.2	MFD-Messungen unter Flussbedingungen mit und ohne Additiv A-AZB-C	192
4	Zusammenfassung	195
4.1	OPV als molekularer Kraftsensor	195
4.2	Optimierung des Fluoreszenzsignals und der Photostabilität von Fluorophoren	195
4.2.1	Additive zur Steigerung der Signalstärke von Rhodamin 110	195
4.2.2	Die Messungen der Photozerstörung von Rhodamin 123	197
4.3	Optimierung des Fluoreszenzsignals unter Flussbedingungen	198
5	Anhang	200
5.1	Herleitung von Besetzungswahrscheinlichkeiten	200

5.1.1	Das Modell mit den zum Zustand „ST“ zusammengefassten Singulett- und Triplettzuständen (Modell 1b)	200
5.1.2	Herleitung der Relaxationszeiten und Amplituden des Radikalkationterms des Radikalkation-Targetfits (Modell 1b Kapitel 3.2.4.3).....	202
5.1.3	Das Modell mit dem Kationradikal und der Photozerstörung aus jedem der beteiligten angeregten Zustände	205
5.1.4	Das Modell mit dem Radikalkation und Radikalanion	208
5.2	<i>Herleitung der leistungsdichteabhängigen Austauschrate.....</i>	211
5.3	<i>Anmerkung zur Singulettlöschung bei Küvettenexperimenten (Gleichung 3.2-79)</i>	213
5.4	<i>Übersicht der festgehaltenen Parameter für Anpassungen bei Messungen der Photozerstörung.....</i>	215
5.5	<i>Detaillierte Ergebnisse der Anpassungen der FCS-Kurven</i>	215
5.6	<i>Die Abnahme der Konzentration der Fluorophore in den verwendeten Probenkammern ...</i>	229
5.7	<i>Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(FCS)$ bei FCS-Messungen des Rh 110 mit und ohne Additive</i>	230
5.8	<i>Erweiterung des elektronischen Zustandmodells für gepulste Anregung.....</i>	231
5.9	<i>Diffusionskontrollierte Stoßrate</i>	233
5.10	<i>Abkürzungen.....</i>	235
5.11	<i>Chemikalienliste</i>	236
5.12	<i>Chemische Struktur einiger ausgewählter Verbindungen.....</i>	237
Literatur		238
Danksagung		244
Erklärung		246
Manuskripte		247
	<i>Tuning microfluidic mixers for ultrasensitive kinetic measurements using FCS and numerical methods</i>	248
	<i>Tuning microfluidic mixers for ultrasensitive kinetic measurements using FCS and numerical methods (Supporting Information)</i>	269
	<i>Fluorophors as Optical Sensors for Local Forces</i>	276
	<i>Fluorophors as Optical Sensors for Local Forces (Supporting Information)</i>	284

Einleitung

Aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen Detektierbarkeit und hohen Empfindlichkeit spielt die Fluoreszenz eine wichtige Rolle bei der Untersuchung chemischer und biologischer Proben. Die spektralen Eigenschaften der Fluoreszenz, die Fluoreszenzlebensdauer, die Fluoreszenzanisotropie und die Fluoreszenzquantenausbeute enthalten wertvolle Informationen über die elektronische Struktur, die Beweglichkeit und die räumliche Orientierung der Fluorophore [1]. Darüber hinaus können mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*FCS*) aus den zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenzintensität korrelierte molekulare Prozesse herausgearbeitet und Aussagen über Reaktionsgleichgewichte (Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten), spezifische photochemische und photophysikalische Eigenschaften des Fluorophors (Tripletteigenschaften, *cis-trans*-Isomerisierung) und Transporteigenschaften (Diffusion, gerichteter Fluss und Rotation) getroffen werden [2-6]. Die Informationen über die Struktur und die Dynamik einer fluoreszierenden Probe auf der Ebene der einzelnen Moleküle kann mittels der Multiparameterfluoreszenzdetektionstechnik (*MFD*) [7-11], bei der mehrere der erwähnten Größen der Fluoreszenz simultan erfasst werden, gewonnen werden. Daher wird die Fluoreszenz im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um Informationen über Fluorophore und ihre Umgebung zu gewinnen.

Zuerst wurde die Eignung eines Oligophenylenvinylenderivats (*OPV 5*) [12-18] mit verdrehtem Molekülgerüst als fluoreszentem Kraftsensor in einer Polyvinylchlorid-Folie untersucht. Dafür wurden die Fluoreszenzeigenschaften von mit *OPV 5* dotierten unter mechanischer Spannung sich verformenden Folien mittels einer Kombination aus einer Zugvorrichtung und einem *MFD*-Aufbau gemessen.

Die Bestimmung einer beliebigen Eigenschaft der Fluoreszenz erfordert die Detektion einer möglichst großen Anzahl von Fluoreszenzphotonen. Daher wird die maximale Genauigkeit mit der eine der Größen der Fluoreszenz bestimmt werden kann, unter anderen durch die maximale Anzahl der Fluoreszenzphotonen, die ein Fluorophor emittiert, begrenzt. Dies trifft besonderes auf Einzelmolekültechniken zu, mit denen einzelne Fluorophore untersucht werden, die jeweils nur eine kleine

Anzahl Photonen emittieren können. Ein einfacher Ansatz zur Erhöhung der Anzahl an Fluoreszenzphotonen ist die Steigerung der Anregungsleistungsdichte. Dabei ist zu beachten, dass es bei hohen Anregungsleistungsdichten häufiger zu einer unerwünschten Besetzung nicht fluoreszierenden elektronischen Zustände (Triplett- und Radikalzustände) kommt. Die langen Lebensdauern solcher nicht fluoreszierender elektronischer Zustände führen zu einer raschen Sättigung des Fluoreszenzsignals. Zusätzlich begünstigen die längeren Lebensdauern von Triplett- und Radikalzuständen die Photozerstörung aus diesen Zuständen. Daher wurde als Nächstes die fluoreszenzsignalsteigernde Wirkung von drei chemischen Additiven mit unterschiedlichen Redoxpotentialen 4-[(4-Aminophenyl)diazanyl]benzoesäure (*A-AZB-C*), 4-(Phenylazo)-benzoesäure (*AZB-C*) und 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (*Trolox*) auf das Fluorophor *Rhodamin 110* (*Rh 110*) untersucht. In diesem Zusammenhang wurden die photochemischen Eigenschaften des Fluorophors *Rhodamin 110* mittels *FCS* und der Analyse der Leistungsdichteabhängigkeit der Fluoreszenzintensität charakterisiert.

Die Maximierung des Fluoreszenzsignals spielt insbesondere bei einer kurzen Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Detektionsvolumen eine große Rolle, da in diesem Fall nur wenige Fluoreszenzphotonen detektiert werden können. Die Verkürzung der Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Detektionsvolumen und die damit einhergehende Reduktion des Fluoreszenzsignals kann unter anderem als Folge eines gerichteten Flusses auftreten [19]. Daher war das letzte Ziel dieser Arbeit die Anwendung der Fluoreszenzsignal steigernden Additive als eine Strategie zur Kompensation der flussbedingten Abnahme des Fluoreszenzsignals zu etablieren (Kapitel 3.3). Dafür wurde der von Shawn Pfeil beschriebene, mikrofluidische Mixer [20] mit einem in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. A. M. Seidel entwickelten Multiparameterfluoreszenzdetektions-Aufbau [8, 9] kombiniert. Die Fluoreszenzmessungen in einem Mikromixer erfordern die genaue Kenntnis der in den Kanälen vorherrschenden Strömungsprofile, welche mittels Strömungssimulationen (*CFD*, eng. Computational fluid dynamics) bestimmt werden können. Die Genauigkeit der berechneten Strömungen wird durch Herstellungsprozess-bedingte Abweichungen der Dimensionen der Kanäle eingeschränkt. Deswegen wurden zusätzlich die mit Hilfe der *FCS* direkt gemessenen Flussgeschwindigkeiten[21] in Kombination mit

Strömungssimulationen dazu verwendet, um die Flussprofile im Mikromixer vollständig zu charakterisieren.

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Absorption und Emission von Strahlung bei organischen Chromophoren¹

1.1.1 Absorption von Licht

Die Absorption des Lichts von Materie wird auf makroskopischer Ebene durch das Gesetz von Lambert und Beer (Gleichung 1.1-1) beschrieben.

$$E(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad 1.1-1$$

λ = Wellenlänge der Strahlung

$I_0(\lambda)$ = eingestrahlte Strahlungsintensität

$I(\lambda)$ = transmittierte Strahlungsintensität

$E(\lambda)$ = Extinktion

c = Konzentration der Chromophore

$\varepsilon(\lambda)$ = Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der Probe

Neben dem Extinktionskoeffizient $\varepsilon(\lambda)$, der üblicherweise in Tabellenwerken angegeben ist, wird häufig der Absorptionsquerschnitt eines Moleküls ($\sigma(\lambda)$) verwendet. Die beiden Größen hängen nach Gleichung 1.1-2 zusammen.

$$\frac{\sigma(\lambda)}{\text{cm}^2} = \frac{\varepsilon(\lambda) \cdot N_A^{-1} \cdot \ln(10)}{\text{mol} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}} \approx \frac{\varepsilon(\lambda) \cdot 3.824 \cdot 10^{-21}}{\text{cm}^2} \quad 1.1-2$$

N_A = Avogadro-Konstante

Bei der Absorption von Energie geht ein Elektron aus dem elektronischen Zustand X_a in einen energetisch höheren Zustand X_n über. Das Jablonski Diagramm (Abbildung 1.1-1) zeigt die wichtigsten elektronischen Zustände eines Farbstoffes. Dabei wird zwischen Singulettzuständen S und Triplettzuständen T unterschieden.

¹ Diese Betrachtung bezieht sich auf im Rahmen dieser Arbeit verwendete organische Fluorophore wie Rhodamine oder Cyanine. Aufgrund der Vielfältigkeit der organischen Chromophore können deren spektroskopische Eigenschaften deutlich von den im Rahmen dieses Kapitels diskutierten Eigenschaften abweichen.

Ein Übergang von einem Singulettzustand zu einem Triplettzustand und umgekehrt ist Symmetrie verboten.

Für die Geschwindigkeitskonstante der Absorption (k_{an}) ausgehend von einem elektronischen Zustand X_a in einen höher angeregten Zustand X_n gilt die allgemeine Gleichung 1.1-3¹ [1]:

$$k_{an} = I(\lambda) \cdot \sigma_{an}(\lambda) \cdot \frac{\lambda}{h \cdot c} = I(\lambda) \cdot \sigma_{an}(\lambda) \cdot \gamma \quad 1.1-3$$

$I(\lambda)$ = Leistungsdichte bei der Wellenlänge λ

h = Planck'sches Wirkungsquantum

c = Lichtgeschwindigkeit

γ = inverse Photonenenergie

Nach der Anregung in einen beliebigen angeregten Zustand (S_n) relaxiert das angeregte Chromophor in der Regel strahlungslos über interne Konversion (IC) und Schwingungsrelaxation (VR) in das niedrigste Schwingungsniveau des ersten angeregten Singulettzustands S_1 (Regel von Kasha). Befindet sich der Chromophor in der Lösung, so erfolgt die Schwingungsrelaxation üblicherweise innerhalb von Femtosekunden bis wenigen Pikosekunden, da die Schwingungsenergie effizient über die Stöße an die Lösungsmittelmoleküle abgegeben werden kann. Für die Rückkehr des Moleküls in den energetisch am tiefsten liegenden Singulett-Grundzustand S_0 sind mehrere Möglichkeiten vorhanden:

- Rückkehr unter Emission eines Photons. Der Prozess wird als Fluoreszenz (F) bezeichnet. Die Lebensdauer des S_1 -Zustands bei organischen Fluorophoren liegt im Bereich von wenigen Nanosekunden.
- Strahlungsloser Übergang unter Abgabe von Wärme (IC).
- Übergang in einen Triplettzustand (ISC). Dieser Übergang ist zwar symmetrieverboten, findet dennoch aufgrund der Spin-Bahn-Kopplung mit sehr kleiner Quantenausbeute statt. Die Lebensdauer des ersten Triplettzustands T_1 beträgt bei organischen Fluorophoren einige Mikrosekunden bis Stunden [1].

¹ Gilt nur für kleine Leistungsdichten, bei hohen Leistungsdichten muss die Sättigung der elektronischen Zustände mit berücksichtigt werden.

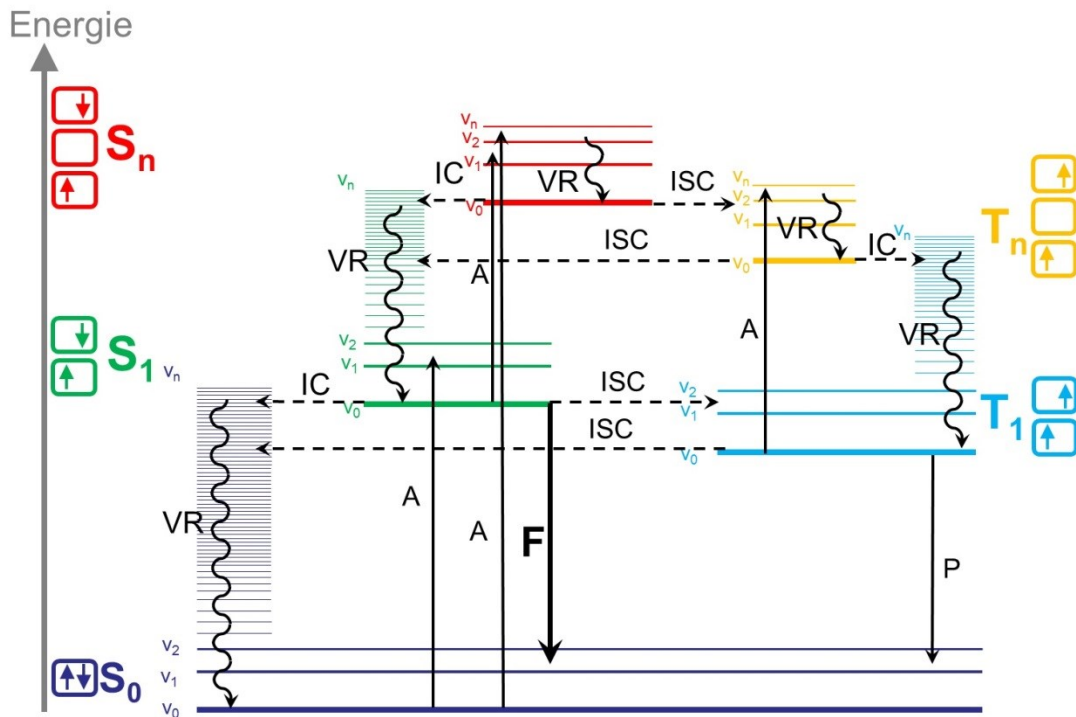


Abbildung 1.1-1 Jablonski-Diagramm: Mögliche Anregungs- und Relaxations-Pfade eines Farbstoffes. Die vertikalen geraden Pfeile stellen Übergänge dar, bei denen ein Photon emittiert oder absorbiert wird. Die „strahlungslosen“ Übergänge sind durch wellenförmige Pfeile dargestellt. Die einzelnen Abkürzungen stehen für: Singulett (S), Triplett (T), Absorption (A), Fluoreszenz (F), Phosphoreszenz (P), Schwingungsrelaxation (VR), interne Konversion (IC) und Multiplizitätsänderung (ISC)

1.1.2 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer

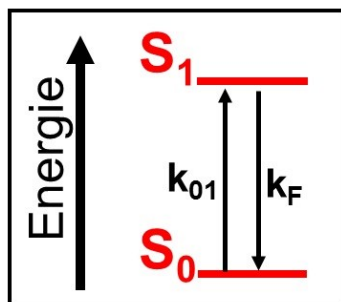


Abbildung 1.1-2 Ein 2-Niveau Energieschema für Anregung eines Fluorophors, mit den Geschwindigkeitskonstanten für die Anregung in den S_1 -Zustand bzw. die Fluoreszenz k_{01}

Der Anteil der Fluoreszenz an der Entvölkerung des S_1 -Zustands wird durch die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_F) angegeben. Die Fluoreszenzquantenausbeute beschreibt das Verhältnis der Anzahl der emittierten (N_F) zur Anzahl der absorbierten (N_{ab}) Photonen (siehe Gleichung 1.1-4) [1].

$$\Phi_F = \frac{N_F}{N_{ab}} \quad 1.1-4$$

Die Quantenausbeute bei einem 2-Niveau Energieschema ohne interne Konversion für die Anregung eines Fluorophors (Abbildung 1.1-2) beträgt $\Phi_F = 1$. Die Lebensdauer des S_1 -Zustands bei einem solchen 2-Niveau Energieschema wird als radiative Fluoreszenzlebensdauer (τ_F) bezeichnet (Gleichung 1.1-5).

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad 1.1-5$$

Das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz wird in diesem Fall nach Gleichung 1.1-6 beschrieben.

$$F(t) = F(0) \cdot \exp(-t / \tau_F) \quad 1.1-6$$

Werden bei dem Energieschema der Triplettzustand und die interne Konversion berücksichtigt¹ (Abbildung 1.1-1), wird die mittlere Lebensdauer des S_1 -Zustands (τ_0) mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten der beteiligten Entvölkerungsprozesse durch Gleichung 1.1-7 beschrieben.

$$\tau_0 = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} = \frac{1}{k_0} \quad 1.1-7$$

τ_0 = mittlere Lebensdauer des S_1 -Zustands bzw. der Fluoreszenz

k_F = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz

k_{IC} = Geschwindigkeitskonstante der internen Konversion

k_{ISC} = Geschwindigkeitskonstante des Übergangs in den Triplettzustand

Damit nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute folgende Form an [1]:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} = \frac{k_F}{k_0} \quad 1.1-8$$

¹Die nachfolgenden Ausführungen gelten nur für niedrige Anregungsleistungen die bei Messungen der Fluoreszenzspektren bzw. Fluoreszenzlebensdauer üblich sind. Bei hohen Anregungsleistungen müssen weitere elektronische Zustände berücksichtigt werden (siehe dazu Kapitel 3.2)

Ist ein weiteres Löschmolekül an der Entvölkerung des S_1 -Zustands beteiligt, so ergibt sich für die Fluoreszenzlebensdauer τ Gleichung 1.1-9:

$$\tau = \frac{1}{k_0 + k_{qS}[Q]} = \frac{1}{k_0} \quad 1.1-9$$

k_{qS} = Geschwindigkeitskonstante der Löschung des Singulettzustands durch ein Löschmolekül
 $[Q]$ = Konzentration der Löschmoleküle

Für die additivabhängige Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_F(Q)$ gilt in dem Fall Gleichung 1.1-10

$$\Phi_F(Q) = \frac{k_F}{k_0 + k_{qS}[Q]} = \frac{k_F}{k_0} \quad 1.1-10$$

Für das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz gilt damit Gleichung 1.1-11.

$$F(t) = F(0) \cdot \exp(-t/\tau) \quad 1.1-11$$

In der Praxis wird die Fluoreszenzquantenausbeute mit Hilfe einer Referenzprobe mit bekannter Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt. Dabei wird folgende Gleichung benutzt [1]:

$$\Phi_F(P) = \Phi_F(R) \cdot \frac{F(P) \cdot E(R) \cdot n^2(P)}{F(R) \cdot E(P) \cdot n^2(R)} \quad 1.1-12$$

(R) = Referenz,

(P) = Probe

E = Extinktion

n = Brechungsindex des Lösungsmittels

F = Gesamte Fluoreszenzintensität

1.1.3 Relaxation eines angeregten Moleküls unter Beteiligung eines anderen Moleküls

Bei einem Zusammenstoß eines angeregten Farbstoffes D^* (D steht für Donor) mit einem weiteren nicht angeregten Molekül Q (Q steht für Löscher, eng. *Quencher*)

können folgende Reaktionen¹ auftreten, die in den nachfolgenden Kapiteln genauer betrachtet werden sollen:

- Energietransfer
- Elektronentransfer
- Exciplexbildung

1.1.3.1 Relaxation eines angeregten Farbstoffes über Energietransfer

Beim Energietransfer wird die Anregungsenergie eines Donors D auf einen Löscher Q (oder Akzeptor) übertragen. Eine notwendige Voraussetzung für die Energieübertrag vom Donor zum Akzeptor ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Allgemein kann zwischen strahlenden und nicht strahlenden Energieübertragungsreaktionen unterschieden werden.

Der strahlende Energietransfer entspricht der Emission eines Photons durch den Donor und anschließende Absorption dieses Photons durch den Akzeptor. Der strahlende Energietransfer erfolgt üblicherweise über eine Distanz, die größer ist als die Wellenlänge des von Donor emittierten Lichts. Die Wahrscheinlichkeit des strahlenden Energietransfers hängt von der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und der Konzentration des Akzeptors ab. Im Gegensatz dazu erfolgt der strahlungslose Energietransfer ohne Emission eines Photons über Distanzen, die kleiner sind als die Wellenlänge des von Donor emittierten Lichts. Hier wird zwischen dem Energietransfer über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung (*Förster*-Energietransfer) und zwischen dem Energietransfer über einen Elektronenaustausch-Mechanismus (*Dexter*-Energietransfer) unterschieden.

Der *Förster*-Energietransfer (auch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer oder kurz *FRET* genannt) erfolgt über eine Distanz von etwa 0.5 bis 10 nm, wobei die Effizienz des Energietransfers mit der sechsten Potenz des Abstands beider Reaktionspartner abnimmt. Charakteristisch für *FRET* ist, dass die Spin-Multiplizität

¹ Hier werden nur für diese Arbeit relevante Relaxationswege eines organischen Farbstoffs mit einem vorgegebenen Schema der beteiligten elektronischen Zustände (siehe Kapitel 3.2.2) beschrieben.

des Akzeptors erhalten bleibt. In der Regel tritt *FRET* als sogenannter Singulett-Singulett-Energietransfer (*SEET*) auf (Abbildung 1.1-3).

Singulett-Singulett –Energietransfer (*SEET*) nach dem *Förster* Mechanismus

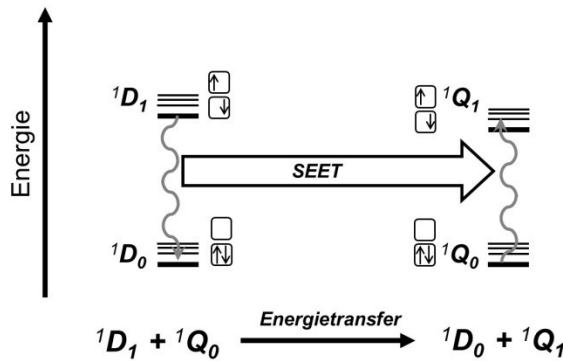


Abbildung 1.1-3 Mechanismus des *FRET*

Unter *SEET* versteht man im Allgemeinen eine Übertragung der Anregungsenergie eines elektronisch angeregten Donors im Singulettzustand auf einen Akzeptor im Singulettgrundzustand. Beim Energietransfer über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung sind (abgesehen von *SEET*) folgende Energietransferreaktionen möglich:

- $^1D_1 + ^3Q_n \rightarrow ^1D_0 + ^3Q_{n+1}$ (Energietransfer auf höheren Triplettzustand des Akzeptors)
- $^3D_1 + ^1Q_0 \rightarrow ^1D_0 + ^1Q_1$ (Triplett-Singulett-Energietransfer)
- $^3D_1 + ^3Q_n \rightarrow ^1D_0 + ^3Q_{n+1}$ (Energietransfer auf einen höheren Triplettzustand des Akzeptors)

Im Vergleich zu *FRET* sind für den *Dexter*-Energietransfer deutlich kürzere Distanzen von < 1 nm notwendig, da hier die Orbitale der beteiligten Reaktionspartner überlappen müssen. Die Effizienz des *Dexter*-Energietransfers nimmt exponentiell mit dem Abstand der beiden Reaktionspartner ab. Da bei dem *Dexter*-Energietransfer zwei Elektronen ausgetauscht werden, können sich beim *Dexter*-Energietransfer die Spin-Multiplizitäten des Akzeptors und des Donors ändern (vergl. Abbildung 1.1-4). Durch einen *Dexter*-Energietransfers ist sowohl Singulett-Singulett-Energietransfer als auch Triplett-Triplett-Energietransfer (*TEET*) möglich. Unter *TEET* versteht man im Allgemeinen eine Übertragung der

Anregungsenergie eines elektronisch angeregten Donors im Triplettzustand auf einen Akzeptor im Singulettgrundzustand.

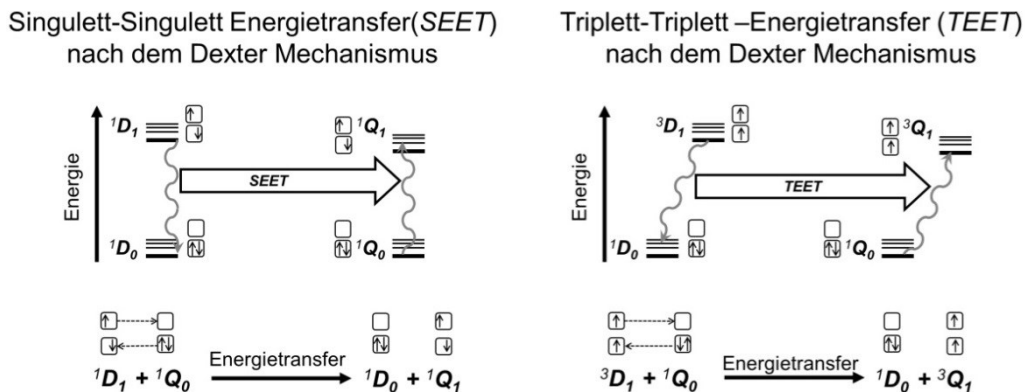


Abbildung 1.1-4 Mechanismus des Dexter-Energietransfers

1.1.3.2 Relaxation eines angeregten Farbstoffes über einen Elektronentransfer

Ein Zusammenstoß zwischen einem angeregten Molekül und einem Löscher kann zu einem Elektronentransfer führen, wenn die freie Enthalpie für diesen Prozess negativ ist (vergl. Rehm-Weller-Gleichung Gleichung 1.1-13 [22, 23]).

Nach einem Zusammenstoß eines angeregten Farbstoffes mit einem Löscher kann es entweder zur Bildung eines Exciplexes¹ mit anschließender Entstehung eines solvatgetrennten Radikationenpaares oder direkt zur Bildung eines solvatgetrennten Radikationenpaares kommen. Nach einem Elektronentransfer kann sofort eine Rekombination der beiden gebildeten Ionen stattfinden, so dass am Ende der Reaktion die beiden Reaktionspartner wieder im elektronischen Grundzustand vorliegen (vergleiche Abbildung 1.1-5).

$$\Delta G_{ET(D^*,Q)} = E_{ox} - E_{red} - E_{D^*} + \Delta G(\varepsilon) \quad 1.1-13$$

$\Delta G_{ET(D^*,Q)}$ = freie Enthalpie für Elektronentransfer zwischen einem Löscher Q und einem angeregten Zustand D^* eines Donors.

E_{ox} , E_{red} = Oxidations- bzw. Reduktionspotenzial der beteiligten Komponenten

E_{D^*} = Übergangsenergie des angeregten Zustands D^*

$\Delta G(\varepsilon)$ = ein Term, der die Coulomb-Wechselwirkung und die Solvatisierung durch

¹ Im Rahmen dieses Kapitels wird die Relaxation über Bildung eines Komplexes am Bsp. Von einem Exciplex erläutert, wobei alle beschriebenen Reaktionspfade ohne weiteres bei einem Grundzustandskomplex, der durch die Absorption eines Photons angeregt wird, möglich wären.

Lösungsmittelmoleküle für das neugebildete Ionenpaar beschreibt. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieser Term als vernachlässigbar angenommen [24].

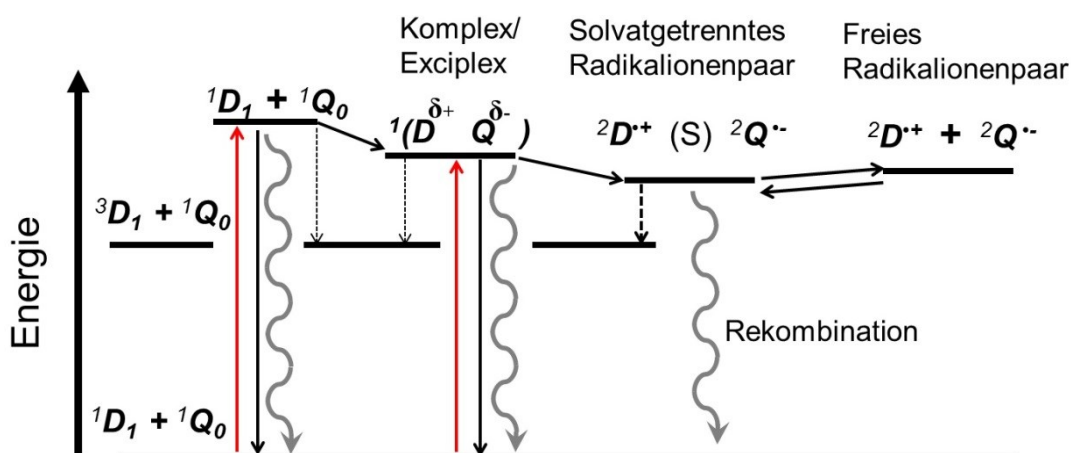


Abbildung 1.1-5 Der Mechanismus der Relaxation eines angeregten Farbstoffs über Bildung eines Exciplexes bzw. eines angeregten Grundzustandkomplexes mit anschließenden Ladungstrennung und einer Rekombination. Der rote Pfeil repräsentiert die direkte Anregung des Donors bzw. des Grundzustandkomplexes, die durchgezogenen vertikalen schwarzen Pfeile repräsentieren Relaxation unter Emission eines Photons, die gewellten Pfeile repräsentieren die strahlungslose Relaxation, die gestrichelte Pfeile repräsentieren die Triplettübergänge [25].

Verläuft die Rekombination sehr schnell (< 20 ns), so dass sich keine freien Ionen bilden können, wird meistens¹ die Multiplizität der beiden Reaktionspartner aufgrund der Spin-Spin-Kopplung erhalten bleiben. Bei einer langsamen Rekombination kann das ursprüngliche Ionenpaar zu freien Ionen solvatisiert werden. Dies hat zu Folge, dass die Rekombination als eine bimolekulare Reaktion zwischen zwei Dubletts angesehen werden kann. Damit können sowohl der angeregte Singulettzustand als auch der Triplettzustand eines Farbstoffes in den Singulettgrundzustand über einen Elektronentransfer mit anschließender langsamer Rekombination relaxiert werden.

1.1.4 Fluoreszenzanisotropie

In einer Lösung sind die Orientierungen der Übergangsdipolmomente zufällig verteilt. Wird eine solche Probe mit polarisiertem Licht angeregt, so wird die Strahlung auch von denjenigen Fluorophoren absorbiert, deren Absorptionsübergangsdipolmomente ($\vec{a}$) nicht exakt parallel zum Feldvektor ($\vec{E}$) des An-

¹ Der Übergang des Donors in den Triplettzustand ist grundsätzlich aufgrund von Spin-Bahn-Kopplung ist Grundsätzlich möglich, wobei die Wahrscheinlichkeit eines solchen Überganges klein ist.

regungslichts liegen. Wobei diejenigen Fluorophore, deren Vektor $\vec{a}$ exakt parallel zum Feldvektor $\vec{E}$ ausgerichtet ist, am wahrscheinlichsten das Licht absorbieren werden. Dieses Phänomen nennt man Photos Selektion (Abbildung 1.1-6). Bei anschließender Emission des absorbierten Lichtes ist die emittierte Strahlung aufgrund der Photos Selektion nicht mehr linear polarisiert. Dieses Phänomen als Fluoreszenz anisotropie (r) bezeichnet. r ist dabei durch Gleichung 1.1-14 definiert [1]:

$$r = \frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad 1.1-14$$

r = Anisotropie

θ = Winkel zwischen $\vec{a}$ und $\vec{E}$

Bei statistisch verteilten Molekülen gilt für die Anisotropie der Wert $r = 0.4$ [1]. Für nicht statistisch verteilte Moleküle sind zwei Grenzfälle denkbar:

- alle Moleküle sind so angeordnet, dass die Übergangsdipolmomente ($\vec{a}$) parallel zum Feldvektor ($\vec{E}$) ausgerichtet sind ($\theta = 0^\circ$), somit würde die Fluoreszenz anisotropie den Wert $r = 1$ annehmen (siehe Gleichung 1.1-14)
- alle Moleküle sind so angeordnet, dass die Übergangsdipolmomente ($\vec{a}$) senkrecht zum Feldvektor ($\vec{E}$) ausgerichtet sind ($\theta = 90^\circ$), die Fluoreszenz anisotropie würde in dem Fall den Wert $r = -0.5$ annehmen (siehe Gleichung 1.1-14).

Zwischen der Absorption und Emission eines Photons kann sich die Richtung des Übergangsdipolmoments aufgrund der Rotationsdiffusion des Fluorophors ändern. Die Perrin-Gleichung (Gleichung 1.1-15) beschreibt diesen Zusammenhang [1]:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}} \quad 1.1-15$$

$$\rho = \frac{V\eta}{k_b T} \quad 1.1-16$$

r_0 = fundamentale Fluoreszenz anisotropie

r = Fluoreszenz anisotropie

τ = Fluoreszenzlebensdauer
 ρ = Rotationskorrelationszeit
 V = Molekylvolumen
 η = Viskosität des Lösungsmittels
 k_b = Boltzmann-Konstante
 T = Temperatur

Die fundamentale Fluoreszenzanisotropie r_0 ist nach Gleichung 1.1-15 der Grenzwert der Fluoreszenzanisotropie, bei einer sehr lange Rotationsdiffusion ($\rho \gg \tau_F$) bzw. bei einer sehr kurzen Fluoreszenzlebensdauer ($\tau_F \ll \rho$). r_0 ist eine fluorophorspezifische Konstante für statistisch verteilte Moleküle und ist vom Winkel (β) zwischen dem Absorptionsübergangsdipolmoment $\vec{a}$ und dem Emissionsübergangsdipolmoment $\vec{f}$ abhängig (siehe Abbildung 1.1-6) [1]. Für Winkel β zwischen $0 \leq \beta \leq 90^\circ$ folgen aus Gleichung 1.1-17 die Grenzwerte der fundamentalen Anisotropie $-0.2 \leq r_0 \leq 0.4$

$$r_0 = \frac{3\cos^2 \beta - 1}{2} \cdot \frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} = 0.4 \cdot \frac{3\cos^2 \beta - 1}{2} = \frac{3\cos^2 \beta - 1}{5} \quad 1.1-17$$

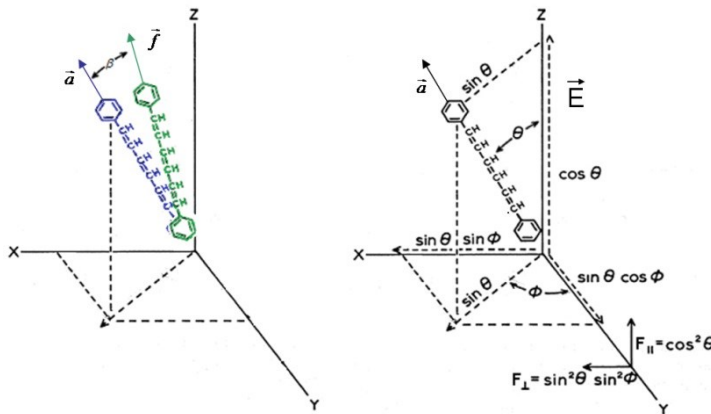


Abbildung 1.1-6: Moleküldipolmomente und Anisotropie [1]: (Links) schematische Darstellung des Winkels (β) zwischen dem Absorptionsübergangsdipolmoment $\vec{a}$ (blau) und dem Emissionsübergangsdipolmoment $\vec{f}$ (grün). (Rechts) schematische Darstellung des Winkels (θ) zwischen dem Absorptionsübergangsdipolmoment $\vec{a}$ und dem Feldvektor des Anregungslichts

In der Fluoreszenzspektroskopie wird die Fluoreszenzanisotropie unter Verwendung von Anregungs- und Emissionspolarisatoren gemessen. Die Fluoreszenzanisotropie ist in dem Fall durch die Gleichung 1.1-18 definiert.

$$r = \frac{F_V - F_H}{F_V + 2F_H} \quad 1.1-18$$

F_V = Fluoreszenzintensität vertikal zur Polarisationssebene des Anregungslichts

F_H = Fluoreszenzintensität horizontal zur Polarisationssebene des Anregungslichts

1.1.5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. *fluorescence correlation spectroscopy*; FCS) ist eine spektroskopische Technik zur Untersuchung von thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften von Molekülen in Lösung.

Die Grundlage für FCS bildet meist ein konfokales Fluoreszenzaufbau (vergl. Abbildung 2.3-1). Das Anregungslicht wird mit Hilfe eines Objektivs in die Probe fokussiert, sodass ein möglichst kleines Anregungsvolumen entsteht. FCS basiert auf der statistischen Analyse von Intensitätsfluktuationen des Fluoreszenzsignals im Anregungsvolumen. Dabei wird das zeitabhängige Fluoreszenzsignal $F(t)$, das durch Fluktuationen $\delta F(t)$ um einen Mittelwert $\langle F \rangle$ beschrieben werden kann (Gleichung 1.1-19), in Form einer normierten Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ analysiert (Gleichung 1.1-20) [3, 26].

$$F(t) = \delta F(t) + \langle F \rangle \quad 1.1-19$$

$$G(t_c) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + t_c) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad 1.1-20$$

t_c = Korrelationszeit

Der Zeitbereich der kinetischen Prozesse, die mit Hilfe der FCS untersucht werden können, liegt zwischen wenigen Nanosekunden bis zu mehreren Sekunden. Bei den kinetischen Prozessen handelt es sich unter anderem um Triplettkinetiken [2], Translationsdiffusion, gerichtete Transportprozesse [3, 4] oder chemische Umwandlungen [5]. Wenn die Signalfuktuationen auf verschiedene voneinander unabhängige Prozesse zurückzuführen sind, kann die Korrelationsfunktion als Summe der einzelnen Terme beschrieben werden (Gleichung 1.1-21) [27].

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \sum_i G_i(t_c) \quad 1.1-21$$

Gekoppelte Prozesse müssen in einer gemeinsamen Funktion behandelt werden [27].

Im Laufe dieser Arbeit wurden folgende Prozesse mittels *FCS* untersucht:

- Diffusion (siehe Gleichung 1.1-22) [3, 28]
- Aktiver Transport aufgrund eines laminaren Flusses (siehe Gleichung 1.1-23) [3, 4, 29]
- Triplettübergänge (siehe Gleichung 1.1-24) [2]
- Radikalbildung (siehe Gleichung 1.1-25) [30]

$$G(t_c) = \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t_c}{(z_0 / \omega_0)^2 \cdot t_D}}} \quad 1.1-22$$

$$G(t_c) = \text{EXP} \left(- \left(\frac{t_c}{t_f} \right)^2 \right) \quad 1.1-23$$

$$G(t_c) = \text{EXP} \left(- \frac{t_c}{t_T} \right) \quad 1.1-24$$

$$G(t_c) = \text{EXP} \left(- \frac{t_c}{t_R} \right) \quad 1.1-25$$

$G(t_c)$ = Korrelationsfunktion

t_c = Korrelationszeit

t_d = Diffusionszeit (die Zeit, die ein frei diffundierender Fluorophor braucht um das konfokale Volumen zu durchqueren)

t_f = Flusszeit

t_T = Triplettrelaxationszeit

t_R = Radikalrelaxationszeit

ω_0/z_0 = Parameter, die das konfokale Messvolumen charakterisieren (z_0 = Radius des Volumens entlang der z-Achse, ω_0 = Radius des Volumens in der x-y Ebene)

Die radiale und axiale Ausdehnung des konfokalen Volumens wird mit den Parametern ω_0 und z_0 beschrieben, wobei ω_0 und z_0 den räumlichen Bereich, innerhalb dessen die detektierte Intensität auf e^{-2} abgefallen ist, beschreiben [31].

$$\omega_0 = \sqrt{4 \cdot D \cdot t_d} \quad 1.1-26$$

ω_0 = Radius des konfokalen Messvolumens in x-y Ebene

z_0 = Radius des Volumens in der z-y (oder z-x) Ebene,

D = Diffusionskoeffizient des Fluorophors

t_d = Diffusionszeit

Die charakteristische Diffusionszeit t_d liefert bei bekanntem Diffusionskoeffizienten D des Fluorophors den fokalen Radius ω_0 des Experiments [31].

1.2 Photozerstörung

Eine der Möglichkeiten für die angeregten Farbstoffe in einen stabileren Zustand zu gelangen, ist die Umsetzung der Anregungsenergie in einer irreversiblen chemischen Reaktion (Photozerstörung) [32-36]. In nicht entgasten Lösungen reagieren angeregte Farbstoffe häufig mit Sauerstoff, wobei der Sauerstoff sich sowohl positiv als auch negativ auf die Photostabilität eines Farbstoffes auswirken kann [32, 37]. Bei der Reaktion der Farbstoffmoleküle untereinander zu den Photoprodukten wird eine Reaktionskinetik zweiter Ordnung erwartet [32-38].

1.2.1 Geschwindigkeit der Photozerstörung

Während bei der Photozerstörung durch den gelösten Sauerstoff (Sauerstoff in großem Überschuss) eher eine Reaktionskinetik zweiter bzw. pseudo-erster Ordnung (bei kleinen Farbstoffkonzentrationen) zu erwarten ist, wird bei der monomolekularen Reaktion ausschließlich eine Reaktionskinetik erster Ordnung erwartet.

Wird für die Photozerstörungsreaktion eine Reaktionskinetik erster Ordnung angenommen, so kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine makroskopische Geschwindigkeitskonstante k_z ausgedrückt werden (Gleichung 1.2-1). Diese beschreibt den zeitlichen Abfall der Konzentration der Fluorophore $c_F(t)$.

$$\frac{dc_F(t)}{dt} = -k_z \cdot c_F(t) \quad 1.2-1$$

mit der Lösung

$$c_F(t) = c_F(0) \cdot \exp(-k_z \cdot t) \quad 1.2-2$$

Der Fluoreszenzabfall in einer bestrahlten Lösung mit dem Volumen V_{ill} kann durch Gleichung 1.2-3 ausgedrückt werden. [39]:

$$F(t) = F_0 \exp(-k_z \cdot t) = \Phi_F \cdot S_{1eq} \cdot c_F(0) \cdot V_{ill} \cdot \tau_0^{-1} \cdot \exp(-k_z \cdot t) \quad 1.2-3$$

F_0 = Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt $t = 0$

k_z = makroskopische Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung

Φ_F = Fluoreszenzquantenausbeute

S_{1eq} = stationäre Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands

$c_F(0)$ = Konzentration des Fluorophors zum Zeitpunkt $t = 0$

V_{ill} = bestrahltes Volumen¹

τ_0 = Lebensdauer der Fluoreszenz

1.2.2 Quantenausbeute der Photozerstörung

Die mikroskopische Löschrates für die Fluoreszenz wird durch die Quantenausbeute der Photozerstörung Φ_b und der Fluoreszenzlebensdauer τ_0 beschrieben [39]:

$$k_b = \frac{\Phi_b}{\tau_0} \quad 1.2-4$$

Durch Gleichung 1.2-5 ist die makroskopische Löschrates k_z mit der Quantenausbeute der Photozerstörung Φ_b (Verhältnis von den photozerstörten Molekülen zu den absorbierten Photonen) verbunden.

$$\Phi_b = \frac{V_{ill} \cdot k_z}{\sigma_{01} \cdot \gamma \cdot b_c \cdot P} \quad 1.2-5$$

σ_{01} = molekularer Absorptionsquerschnitt für den Übergang aus dem S_0 in den S_1 Zustand

γ = inverse Photonenenergie

b_c = optische Weglänge

P = Anregungsleistung

¹ Zu beachten ist, dass bei einem Experiment mit einer Küvette in der Regel nicht das gesamte Volumen einer Probe bestrahlt werden kann. Unter der Voraussetzung, dass die Probe in der Küvette sehr schnell durchmischt wird (Mischgeschwindigkeit $\gg$ Photozerstörungsgeschwindigkeit), kann für das bestrahlte Volumen V_{ill} das gesamte Volumen einer Probe eingesetzt werden.

Der Kehrwert der Quantenausbeute der Photozerstörung entspricht der Anzahl der überlebten Absorptionszyklen eines Fluorophors. Damit kann die mittlere Anzahl der Photonen $\langle N_{ph(max)} \rangle$, die ein Fluorophor emittieren kann bevor er ausgebleichen ist, mit Hilfe der Gleichung 1.2-6 berechnet werden.

$$\langle N_{ph(max)} \rangle = \Phi_b^{-1} \cdot \Phi_F(Q) \quad 1.2-6$$

2 Allgemeine Methoden

2.1 *Absorptionsspektroskopie*

Als Absorptionsspektrometer wurde ein Cary-300 Bio (Varian) verwendet. Alle Messungen wurden in Quarzküvetten (Hellma) mit einer Schichtdicke von $1 \times 0,4$ cm (Vol. 1,5 mL) durchgeführt. Die Spektren wurden nach einer Basislinienkorrektur gegen eine Referenzküvette mit dem Lösungsmittel aufgenommen.

2.2 *Fluoreszenzspektroskopie*

Für die Messung der stationären Fluoreszenz wurde ein FluoroLog-3 (Jobin Yvon Horiba) verwendet. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Lampe mit einer Leistung von 400 W (Osram). Die Messungen wurden in Quarzküvetten (Hellma) mit einer Schichtdicke von $1 \times 0,4$ cm (Vol. 1,5 mL) durchgeführt.

Für die Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie und der Fluoreszenzlebensdauer wurde ein 5000 U Spektrometer (IBH) verwendet. Als Lichtquelle diente ein gepulster Diodenlaser (Picoquant) mit einer Repetitionsrate von $k_{rep} = 10$ MHz Wellenlänge von $\lambda = 471$ nm.

2.3 *Fluoreszenzmessungen am Einzelmolekülfluoreszenzaufbau*

Speziell für FCS und Einzelmolekülmessungen wurde ein modifiziertes konfokales Mikroskop (IX71, Olympus) [8] (Abbildung 2.3-1) verwendet. Da im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Modifikationen desselben Aufbaus verwendet wurden, ist in diesem Kapitel nur das allgemeine Funktionsprinzip des Fluoreszenzaufbaus erläutert.

Bei dem Fluoreszenzaufbau wird das Anregungslicht über einen dichroitischen Strahlteiler in ein Wasserimmersions-Objektiv (UPLAPO 60 $NA = 1.2$, Olympus) eingekoppelt und in einer Probe fokussiert. Das Fluoreszenzsignal der Probe wird durch das gleiche Objektiv gesammelt, und mit einer Tubuslinse auf einer Lochblende, die das Anregungsvolumen in axialer Richtung begrenzt, abgebildet.

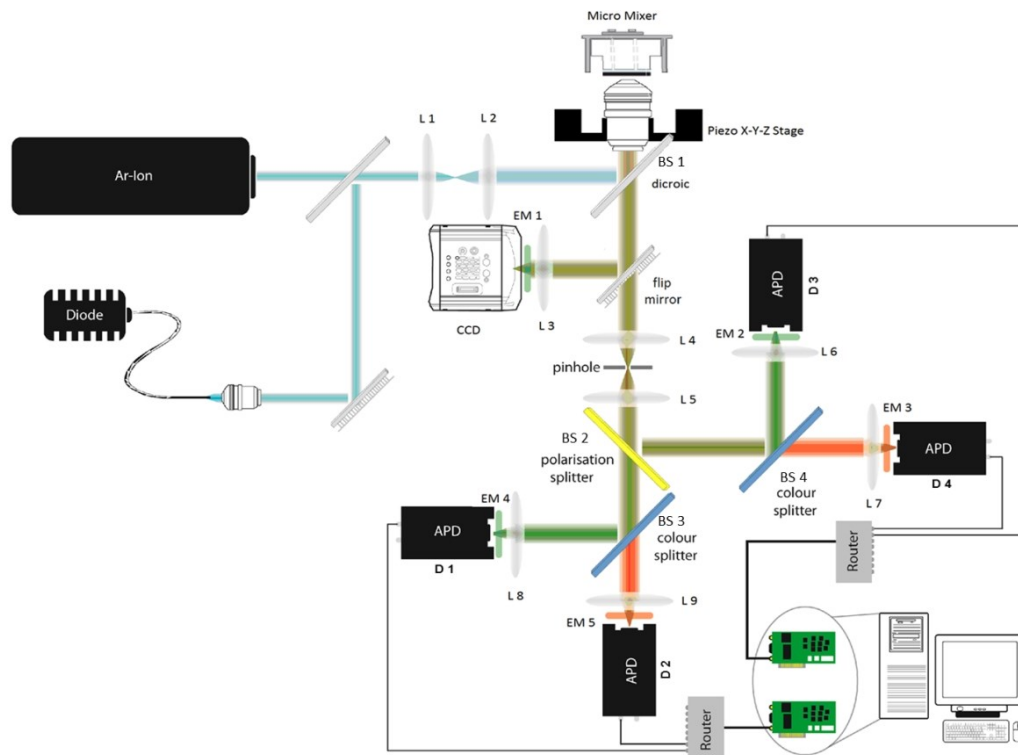


Abbildung 2.3-1 Fluoreszenzaufbau für die Durchführung von *FCS* und Einzelmolekülmessungen. [8, 40]

Der Fluoreszenzstrahl wird mit einem Polarisationssteiler in zwei Polarisations Ebenen (parallel und senkrecht zur Polarisations Ebene des Anregungslichts) getrennt. Jede der Polarisations Ebenen wird wiederum mit einem dichroitischen Strahlteiler in zwei Farben (rot, grün) aufgespalten. Jeder Teilstrahl wird mit einer Linse über einen Bandpass Fluoreszenzfilter auf einen Detektor abgebildet. Die Signale der Detektoren werden mit einem Hardware-Korrelator (ALV-5000, ALV-Laser, Langen, Deutschland) oder zwei unabhängigen *PC*-Karten (*SPC-150*, Becker & Hickl) verarbeitet. Zusätzlich kann der Fluoreszenzstrahl mit einem Klappspiegel vor der Lochblende auf eine *CCD* Kamera (*CCD, DV887 ECS-BV*, Andor) umgelenkt werden.

Bei den Einzelmolekülmessungen am Fluoreszenzaufbau wird die Konzentration der Fluorophore so niedrig gewählt ($c \approx \text{pM}$), dass nur einzelne Moleküle im Detektionsvolumen beobachtbar sind. Das Fluoreszenzsignal der einzelnen Moleküle wird dabei mit Hilfe der sogenannten *MFD*-Methode (Multiparameterfluoreszenzdetektion) aufgenommen und ausgewertet [27, 41-43]. Bei dieser Methode wurden zu jedem detektierten Photon zusätzlich mindestens 4 Parameter gespeichert:

- 1 Die zeitliche Reifolge der Photonen (Ereignisnummer $en\#$)
- 2 Der zeitliche Abstand des Photons zum nächsten Laserpuls (Fluoreszenzabklingzeit $\Delta\tau$)
- 3 Der zeitliche Abstand zum nächsten Photon (Δt)
- 4 Die Nummer des Detektors (das spektrale Detektionsfenster und die Polarisation bezüglich der Polarisation des Lasers)

Im Rahmen dieser Arbeit werden drei verschiedene Modifikationen des Fluoreszenzaufbaus verwendet:

- FCS-Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.16)
- Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 1 (Kapitel 3.1.3.1)
- Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 2 (Kapitel 3.3.3.5)

2.4 Selektion eines Einzelmolekülfluoreszenzereignisses bei MFD-Messungen

Bei einer Einzelmolekülmessung besteht die aufgenommene Zählrate hauptsächlich aus dem Untergrundsignal. Da nur die Einzelmolekülfluoreszenz für die weitere Analyse von Interesse ist, werden aus der detektierten Photonenspur die Einzelmolekülereignisse (Fluoreszenzbursts oder Burst) selektiert und die Daten erst dann analysiert (Abbildung 2.4-1). Die Selektion eines Fluoreszenzbursts erfolgt über den zeitlichen Abstand Δt eines jeden Photons. Diffundiert ein einzelner Fluorophor in das Detektionsvolumen, so führt die erhöhte Zählrate zu niedrigeren Δt Werten, die wieder steigen, wenn der Fluorophor aus dem Detektionsvolumen rausdiffundiert. Bei den meisten Einzelmolekülmessungen erreichen die Fluktuationen des Untergrundsignals die gleiche Größenordnung wie das beobachtete Fluoreszenzsignal [44, 45]. Deswegen werden die Δt -Daten mit einem gleitenden Mittelwert geglättet bevor die Fluoreszenzbursts selektiert werden können. Der gleitende Mittelwert glättet den poissonverteilten Untergrund, wobei die Fluoreszenzsignalspitzen erhalten bleiben.

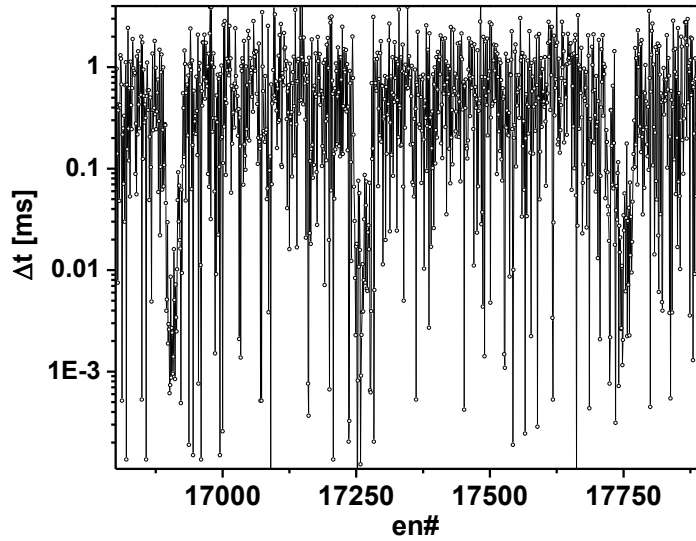


Abbildung 2.4-1 Einzelmolekülphotonenspur von *Rh 123* in Phosphatpuffer (näheres siehe Kap 3.3.3.5).

Die gefilterten Daten $\Delta t^*(en\#)$ sind durch die (Gleichung 2.4-1) gegeben [7, 44]:

$$\Delta t^*(en\#) = \overline{\Delta t}(en\#) = \frac{1}{2m+1} \cdot \sum_{j=-m}^m \Delta t(en\#+j) \quad 2.4-1$$

M = gesamte Anzahl der Photonen

$en\#$ = Ereignisnummer eines Photons

$2m+1$ = Breite des Fenster bei der Bildung des Mittelwerts mit $m < en\# < M-m$

Unterschreitet eine bestimmte minimale Anzahl der aufeinander folgenden Photonen (n_{th}) mit einem geglätteten Wert (Δt^*) einem bestimmten Schwellenwert (Δt_{th}), so wird dieses Ereignis als Einzelmolekülereignis interpretiert. Die Ereignisnummern des ersten und des letzten Photons jedes ausgewählten Einzelmolekülereignisses werden gespeichert. Für die Analyse werden letztendlich nur Photonen von der nicht geglätteten Photonenspur genommen, deren Ereignisnummern einschließlich zwischen den zuvor gespeicherten Ereignisnummern liegen (Abbildung 2.4-2).

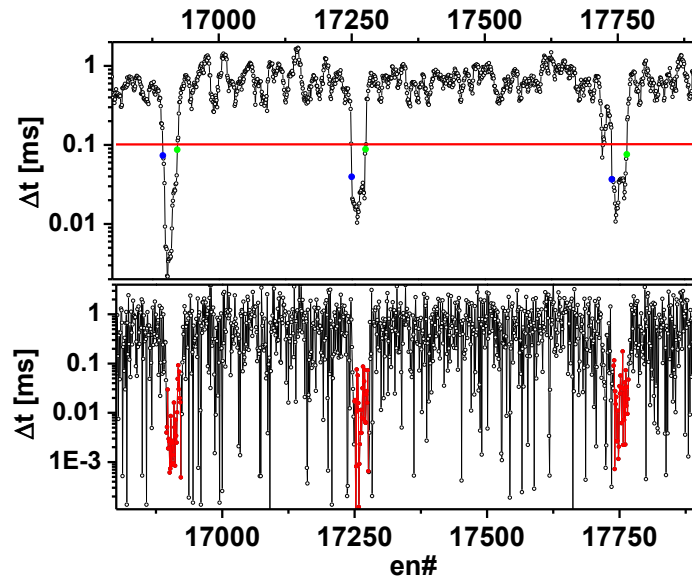


Abbildung 2.4-2 Selektion der Einzelmolekülfluoreszenzbursts von Rh 123 in Phosphatpuffer. Oben: mit einem gleitenden Mittelwert geglättete Δt -Daten ($m = 5$, siehe Gleichung 2.4-1) Mit grün und blau ist das erste bzw. letzte Photon eines ausgewählten Bursts markiert. Die rote Linie zeigt dabei die Schwelle ($\Delta t_{th} = 0.1$ ms, $n_{th} = 10$ Photonen) für die Selektion eines Bursts an. Unten: Unglättete Δt -Daten, mit selektierten Photonen, die rot markierten sind.

2.4.1 Durchmesser der Anregungs- und der Detektionsvolumina zusammen mit Leistungsdichten bei FCS- und Einzelmolekül-Messungen

2.4.1.1 Die mittlere Leistungsdichte bzw. mittlere Leistung eines Laserstrahls mit gaußförmigen Intensitätsprofil

Wird ein Laserstrahl mit gaußförmigem¹ (Gleichung 2.4-2) Intensitätsprofil auf einen Bereich im Raum fokussiert, so entsteht ein Bereich im Raum, mit einer maximalen Leistungsdichte I_0 im Fokusmittelpunkt. Die Leistungsdichte nimmt exponentiell in alle Raumrichtungen mit der Entfernung vom Fokusmittelpunkt ab. Ein Raumbereich, in dem die Leistungsdichte des Lasers $I > I_0 \cdot e^{-2}$ beträgt, wird als Anregungsvolumen bezeichnet.

$$I(x, y, z) = I_0 \cdot \exp\left(-2 \cdot \frac{r^2}{\omega_0^2}\right) \cdot \exp\left(-2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}\right) \quad 2.4-2$$

r = radiale Entfernung vom Fokusmittelpunkt ($r = (x^2 + y^2)^{0.5}$)

ω_0 = Radius des Anregungsvolumens in der x-y Ebene (radiale Entfernung vom Fokusmittelpunkt bei der die Leistungsdichte auf $1/e^2$ abgefallen ist)

z = axiale Entfernung vom Fokusmittelpunkt

z_0 = Radius des Anregungsvolumens entlang der z-Achse (axiale Entfernung vom Fokusmittelpunkt bei der die Leistungsdichte auf $1/e^2$ abgefallen ist)

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzaufbauten betrug das Verhältnis $z_0/\omega_0 > 3.5$.

¹ Das Anregungsprofil bei einem fokussierten Laser entspricht einem Gauß-Lorenz Profil. Im Rahmen dieser Arbeit werden das Anregungsprofil und das Detektionsprofil nur qualitativ diskutiert. Für die qualitative Betrachtung genügt die Annahme eines mit der Gleichung 2.4-2 beschriebenen 3D gaußförmigen Profils

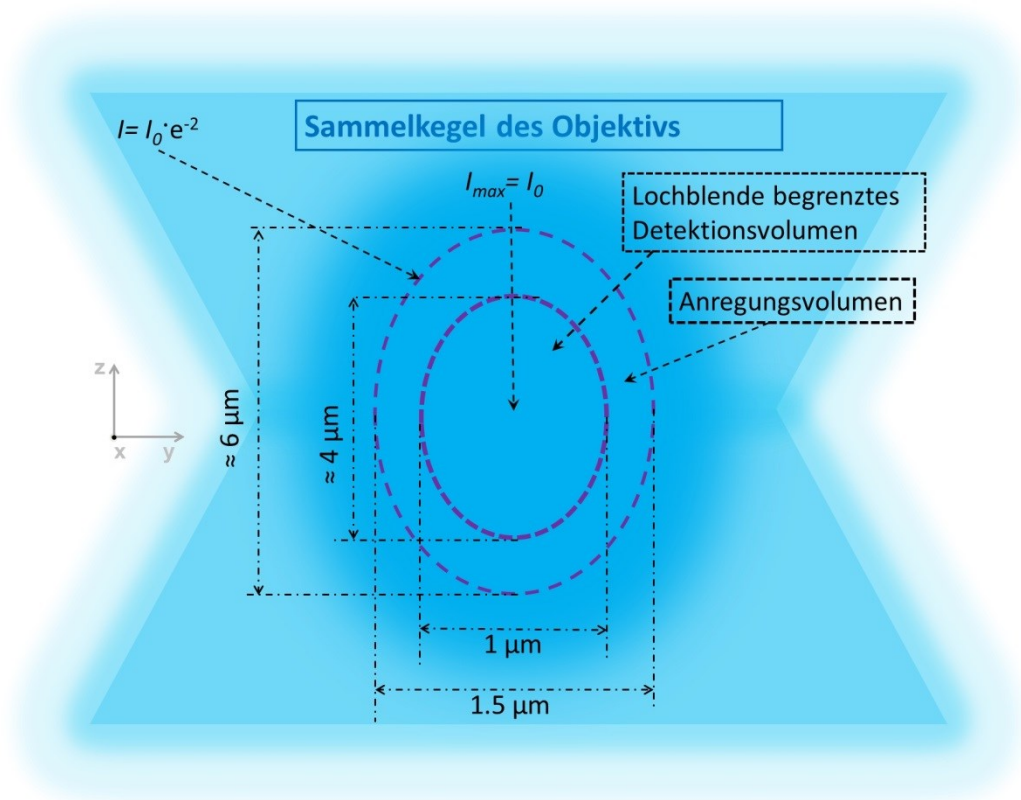


Abbildung 2.4-3 Schematische Darstellung des Anregungsvolumens (Raumbereich innerhalb dessen die Leistungsdichte des Lasers $I > I_0 \cdot e^{-2}$ beträgt) und des konfokalen Volumens (Raumbereich innerhalb dessen die detektierte Fluoreszenzintensität $I_F > I_{F0} \cdot e^{-2}$ beträgt) für den im Kapitel 3.2.3.7 beschriebenen Fluoreszenzaufbau für FCS-Messungen.

Die Leistungsdichte wird im Allgemeinen nach der Gleichung 2.4-3 aus der Leistung und der beleuchteten Fläche bestimmt.

$$\langle I \rangle = \langle P \rangle / (\pi \cdot \omega_0^2) \quad 2.4-3$$

$\langle P \rangle$ = mittlere Leistung des Lasers (wird direkt am Laserstrahl gemessen)
 ω_0 = Radius des Anregungsvolumens in der x-y Ebene.

Die mittlere Leistung $\langle P \rangle$, kann direkt im Laserstrahl mit Hilfe eines Leistungsmessgeräts bestimmt werden. Die maximale Leistung beträgt dabei (unter der Annahme des gaußförmigen Intensitätsprofils):

$$P_{\max} = \langle P \rangle \cdot 2 \quad 2.4-4$$

$P_{\max}$ = Leistung im Maximum des Gauß-Profiles

2.4.1.2 Die mittlere Leistungsdichte bzw. mittlere Leistung der Fluoreszenz bei einem gaußförmigem Intensitätsprofil des Laserstrahls und bei gleichzeitiger Verwendung einer Lochblende

Bei Messungen an einem Fluoreszenzaufbau im Zusammenhang mit der Verwendung einer Lochblende im Detektionsteil des Strahlengangs (vergleiche Abbildung 2.3-1) muss zusätzlich die Transmission der Lochblende berücksichtigt werden. Die verringerte Transmission bei der Verwendung der Lochblende führt dazu, dass das Intensitätsprofil der detektierten Leistung P_F von dem Intensitätsprofil des Lasers abweicht. Damit muss ein zusätzliches Volumen für Messungen mit einer Lochblende definiert werden. Unter der Annahme einer ebenfalls gaußförmigen Verteilung der detektierten Leistungsdichte und einer maximalen detektierten Leistungsdichte im Fokuspunkt I_{F0} , wird der Raumbereich innerhalb dessen die detektierte Leistungsdichte $I_F > I_{F0} \cdot e^{-2}$ als konfokales Volumen (oder Detektionsvolumen) bezeichnet. Die mittlere Anregungsleistungsdichte im Detektionsvolumen kann bestimmt werden indem das arithmetische Mittel der Anregungsleistungsdichte im räumlichen Bereich des Detektionsvolumens gebildet wird.

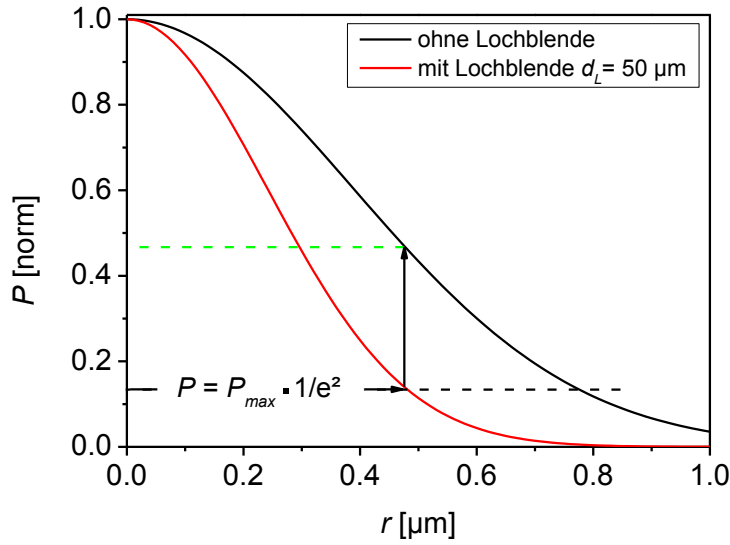


Abbildung 2.4-4 Das Anregungsprofil in x,y-Ebene für den FCS-Fluoreszenzaufbau (schwarze Linie) (Kapitel 3.2.3.7) und das Profil der detektierten Leistung am gleichen Fluoreszenzaufbau bei einer Lochblende mit dem Durchmesser von $d_L = 50 \mu\text{m}$ (rote Linie). Die beiden Profile wurden mit Hilfe der Gleichung 2.4-2 und in Tabelle 2.4-1 zusammengetragenen Werten des ω_0 berechnet. Die Transmission der Lochblende führt dazu, dass bei der Bestimmung der mittleren Anregungsleistung im Detektionsvolumen nicht mehr das gesamte Anregungsprofil verwendet werden kann. Bei dem FCS-Fluoreszenzaufbau mit der Lochblende mit dem Durchmesser von $d_L = 50 \mu\text{m}$ beträgt die mittlere Anregungsleistung (arithmetisches Mittel der Anregungsleistung (schwarze Kurve) oberhalb der grünen gestrichelten Linie) $\langle P_F \rangle = 0.8 P_{\text{max}}$.

Für den im Kapitel 3.2.3.7 beschriebenen Fluoreszenzaufbau bei einem Lochblendendurchmesser von $d_L = 50 \mu\text{m}$ (der Fokusbereich ohne Lochblende betrug dabei $\omega_0 = 0.77 \mu\text{m}$) (Tabelle 2.4-1) bei einem Vergrößerungsfaktor des Objektivs von 60 X) unter Berücksichtigung des gaußförmigen Transmissionprofils der Lochblende gilt für $\langle P_F \rangle$ Gleichung 2.4-5 bzw. für $\langle I \rangle$ Gleichung 2.4-6 (vergleiche Abbildung 2.4-4).

$$\langle P_F \rangle = 0.8 \cdot P_{\text{max}} = \langle P \rangle \cdot 1.6 \quad 2.4-5$$

$$\langle I \rangle = 1.6 \cdot \langle P \rangle / (\pi \cdot \omega_0^2) \quad 2.4-6$$

Bei Einzelmolekülmessungen im mikrofluidischen Mixer wurde ein anderer Fluoreszenzaufbau (Einzelmolekülfuoreszenzaufbau 2 Kapitel 3.3.3.5) verwendet.

Die Einzelmolekülmessungen wurden mit einer Lochblende mit dem Durchmesser von $d = 70 \mu\text{m}$ durchgeführt. Zusätzlich wurde bei Einzelmolekülmessungen ein anderer Laser mit kleinerem Laserstrahldurchmesser im Vergleich zu den *FCS*-Messungen (Kapitel 3.2) verwendet. Dies macht eine Anpassung der Leistungsdichten erforderlich, um die *FCS*-Messungen am *FCS-Fluoreszenzaufbau* (Kapitel 3.2.3.7) mit den *FCS*- oder Einzelmolekül-Messungen am *Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 2* (Kapitel 3.3.3.5) vergleichen zu können. Die Leistungsdichten am *Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 2* wurde an die des *FCS-Fluoreszenzaufbaus* empirisch (unter Zuhilfenahme der Triplettamplitude von *Rh 123*) in Phosphatpuffer angepasst. Dabei wurden die Leistungsdichten so gewählt, dass die Triplettamplituden mit denen am *FCS-Fluoreszenzaufbau* gemessenen übereinstimmen (siehe Abbildung 2.4-5). Für die Einzelmolekülmessungen gilt damit die empirisch ermittelte Gleichung 2.4-7, wobei $\omega_{0(dL=70)}$ in dem Fall dem Radius des konfokalen Volumens bei einer Lochblende mit einem Durchmesser von $d_L = 70 \mu\text{m}$ entspricht.

$$\langle I \rangle = 1.1 \cdot \langle P \rangle / (\pi \cdot \omega_{0(d_L=70)}^2) \quad 2.4-7$$

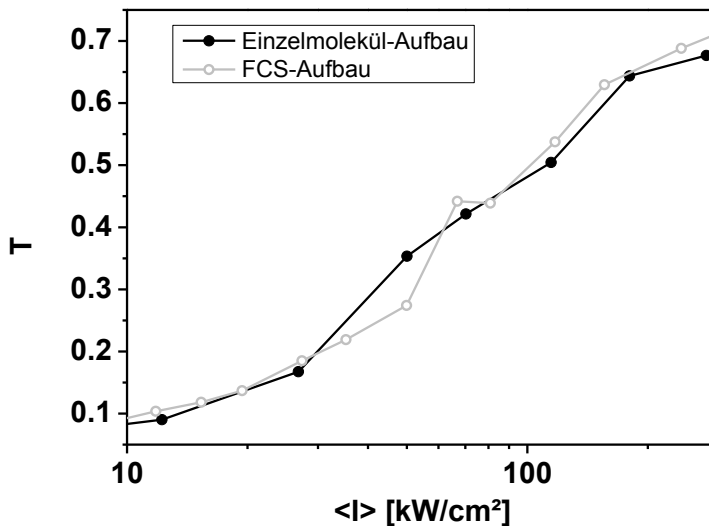


Abbildung 2.4-5 Triplettamplituden des *Rh 123* in Phosphatpuffer gemessen am *FCS*-Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) mit einem Lochblendedurchmesser von $d_L = 50 \mu\text{m}$ und am Einzelmolekülfluoreszenzaufbau (Kapitel 3.3.3.5) mit einem Lochblendedurchmesser von $d_L = 70 \mu\text{m}$. Bei der Berechnung der Leistungsdichten wurde Gleichung 2.4-6 für den *FCS*-Fluoreszenzaufbau und Gleichung 2.4-7 für den Einzelmolekülfluoreszenzaufbau verwendet.

Bei allen Fluoreszenzaufbaukonfigurationen wurde der Konfokalvolumenradius mit Hilfe einer *FCS*-Messung vom *Rh 110* in Wasser bestimmt, wobei zur Berechnung des ω_0 die Gleichung 1.1-26 ($\omega_0 = (4 \cdot D \cdot t_d)^{0.5}$ mit $D_{rh110} = 0.44 \text{ cm}^2/\text{ms}$ [46]) verwendet wurde (vergl. Tabelle 2.4-1).

Tabelle 2.4-1 Radien des konfokalen Volumens (ω_0), Durchmesser der Lochblende (d_L) und Diffusionszeiten (t_d) des <i>Rh 110</i> für verschiedene Konfigurationen des Fluoreszenzaufbaus		
$d_L [\mu\text{m}]$	$t_d (\text{FCS}) [\text{ms}]$	$\omega_0 [\mu\text{m}]$
<i>FCS-Fluoreszenzaufbau (siehe Kapitel 3.2.3.7)</i>		
(Keine Lochblende)	0.34 (0.3[24])	0.77
50	0.13	0.48
<i>Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 2 für Messungen mit Fluss (Kapitel 3.3.3.5)</i>		
30	0.032	0.24
70	0.19	0.58
<i>Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 1 für Folien-Zugexperimente (Kapitel 3.1.3.1)</i>		
50	0.05	0.30

2.4.2 Einfluss der langlebigen elektronischen Zustände auf die Fluoreszenzintensität

Im Rahmen dieser Arbeit werden Fluoreszenzmessungen am konfokalen Fluoreszenzaufbau im Bereich der Anregungsleistungsdichte von $\langle I \rangle \approx 1\text{--}1000 \text{ kW/cm}^2$ durchgeführt (Kapitel 3.2). Im Zusammenhang mit annähernd gaußförmigen Profil der detektierten Fluoreszenzintensität (vergl. Kapitel 2.4.1) muss in Betracht gezogen werden [47], dass bei größeren Leistungsdichten eine Sättigung des Fluoreszenzsignals eintritt, was zu einer Verzerrung der Form des Detektionsvolumens führen kann. In Abbildung 2.4-6 ist der Verlauf des Fluoreszenzsignals von *Rhodamin 110* unter Berücksichtigung von Singulett-, Triplett-, und Radikalkationzuständen bei einem gaußförmigen Anregungsprofil und unterschiedlichen Anregungsleistungsdichten abgebildet. Die Sättigung des

Fluoreszenzsignals führt zu einer Abflachung des Detektionsprofils. Speziell im Zusammenhang mit quadratisch gewichteter Fluoreszenzintensität bei Fluoreszenzmessungen, führt das abgeflachte Detektionsprofil bei hohen Leistungsdichten zu einer stärkeren Gewichtung der Fluorophore, die sich am Rande des Detektionsvolumens befinden. Dies führt zu systematischen Abweichungen bei der Bestimmung der Korrelationstherme aus *FCS*-Messungen bei höheren Leistungsdichten.

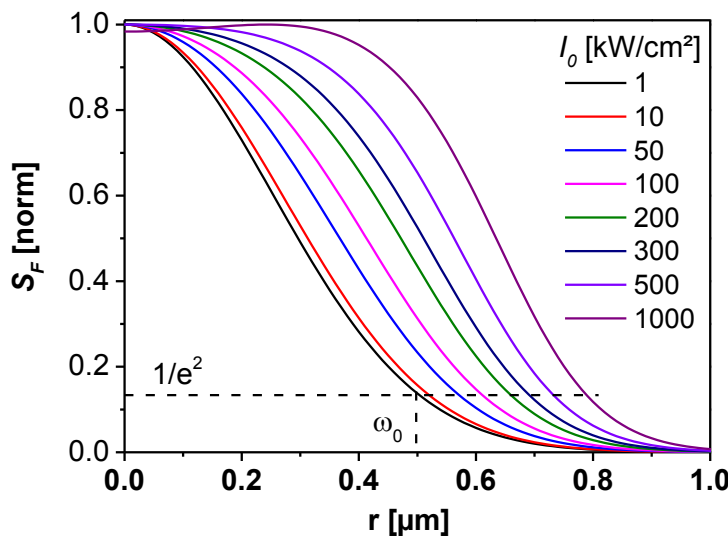


Abbildung 2.4-6 Der Verlauf des Fluoreszenzsignals bei einem gaußförmigen Anregungsprofil in der x-y-Ebene mit $z = 0$, $\omega_0 = 0.5 \mu\text{m}$ (Gleichung 2.4-2) und unterschiedlichen Anregungsleistungsdichten im Fokussmittelpunkt (I_0) (vergl. Kapitel 2.4.1). Es wurde angenommen, dass das normierte Fluoreszenzsignal $S_F[\text{norm}]$ der Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Singulettzustands (S_{1eq} , Gleichung 3.2-17) des *Rh 110* entspricht. Die benötigten Geschwindigkeitskonstanten von *Rh 110* sind in *Tabelle 3.2-14* (Seite 136) angegeben. Die Austauschrate mit der die Fluorophore in das Detektionsvolumen hinein bzw. heraus diffundieren wurde auf $k_{diff} = 8000 \text{ s}^{-1}$ fixiert (vergl. Kapitel 3.2.5)

Ist die Besetzung der langlebigen elektronischen Zustände oder die Photozerstörung schneller als Austauschrate mit der die Fluorophore in das Detektionsvolumen hinein bzw. heraus diffundieren (dies ist bei hohen Leistungsdichten der Fall), so können sich die Fluorophore die sich in langlebigen elektronischen Zuständen befinden in der unmittelbaren Umgebung des Anregungsvolumens anreichern. Dies führt zu einer Verringerung der Konzentration der anregbaren Fluorophore (Fluorophore im elektronischen Grundzustand) im Detektionsvolumen, was eine Verringerung des Fluoreszenzsignals bzw. einer Erhöhung der Gesamtkorrelationsamplitude bei den *FCS*-Messungen nach sich zieht. Dieser Effekt wird zusätzlich verstärkt, wenn die

Leistungsdichten so hoch sind, dass die Fluorophore auch außerhalb des Anregungsvolumens angeregt werden können, weil in dem Fall ein größeres Volumenelement für die Austauschrate der Fluorophore relevant wird.

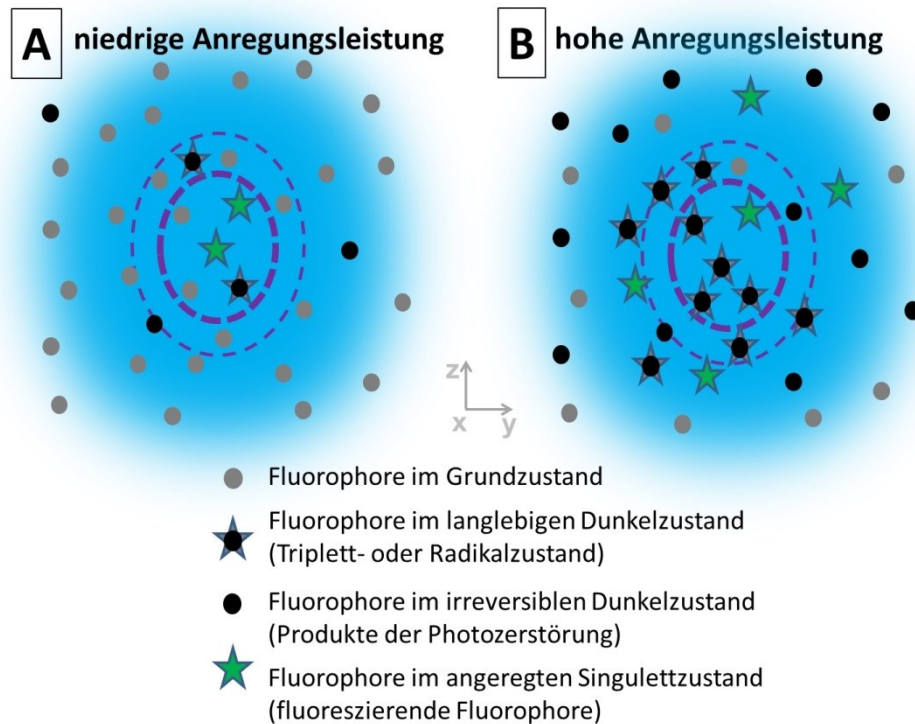


Abbildung 2.4-7 Schematische Darstellung von einer Fluoreszenzmessung am konfokalen Fluoreszenzaufbau (vergl. Kapitel 2.4.1)

Die Fluorophore können frei diffundieren und werden vorzugsweise im Bereich des Anregungsvolumens, dessen Grenze durch die dünne gestrichelte Linie repräsentiert wird, angeregt. Die Detektion der Fluoreszenz findet vorzugsweise dann statt wenn sie sich im Bereich des Detektionsvolumens aufhalten (dicke gestrichelte Linie)

A) Darstellung der Messung bei niedrigen Anregungsleistungen. Die Entstehung der Produkte einer Photozerstörungsreaktion bzw. die Besetzung der langlebigen Dunkelzustände (nicht fluoreszierende Triplet- und Radikalzustände) ist so langsam, dass die Konzentration der Fluorophore in nicht fluoreszierenden elektronischen Zuständen stets sehr klein bleibt. Dabei hat die irreversible Photozerstörung einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Konzentration der Fluorophore in der Umgebung des Anregungsvolumens.

Darstellung der Messung bei hohen Anregungsleistungen. Die Fluorophore werden auch außerhalb des Anregungsvolumens angeregt. Die Entstehung der Produkte der Photozerstörungsreaktion bzw. der Fluorophore in langlebigen Dunkelzuständen ist sehr schnell, so dass eine Anreicherung der Fluorophore, die sich in nicht fluoreszierenden Zuständen befinden, im Detektionsvolumen stattfindet. Die irreversible Photozerstörung hat einen starken Einfluss auf die Konzentration der Fluorophore in der Umgebung des Anregungsvolumens.

Der Einfluss der Besetzung der reversiblen dunklen Zustände auf die Konzentration der anregbaren Fluorophore hängt unter anderen von der Lebensdauer der beteiligten Zustände ab. In der Regel beeinflussen die reversiblen dunklen Zustände die

Konzentration der anregbaren Fluorophore nur in der unmittelbaren Umgebung des Anregungsvolumens, weil die dunklen Zustände in den Grundzustand relaxieren bevor die Fluorophore sich weit von dem Anregungsvolumen entfernen können. Im Vergleich dazu können die Produkte der irreversiblen Photozerstörung beliebig weit von dem Anregungsvolumen entfernen, was dazu führt dass die Photozerstörung die Konzentration der Fluorophore im größeren Umfang beeinflusst (vergl. Abbildung 2.4-7)

3 Experimente und Auswertung

3.1 *OPV als Molekulare Kraftsensoren*

3.1.1 *Vorwort*

Die in diesem Kapitel präsentierten Daten sind im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 663 B4 in Zusammenarbeit mit Stefan Marawske^a Daniel Schmitz^b und Axel Koslowski^c entstanden. Im Rahmen des Projekts wurde von Daniel Schmitz die Verbindung *OPV 5* (Kapitel 5.12) mit verdrehter molekularer Struktur synthetisiert. Um den Einfluss der mechanischen Kräfte auf die Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors zu untersuchen wurden mit *OPV 5* dotierte *PVC*-Folien in einer Zugvorrichtung gedehnt. Die Zugkraft-abhängigen Fluoreszenzeigenschaften von *OPV 5* wurden mittels eines von Stefan Marawske entworfenen und aufgebauten Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.1.3.1) gemessen. Die gemessenen Daten wurden ausgewertet und mit von Axel Koslowski durchgeführten quantenchemischen Simulationen des *OPV 5* verglichen. Die Ergebnisse dieses Projekt wurden in einer Publikation festgehalten [40].

Mein Beitrag zum Projekt bestand hauptsächlich aus der spektroskopischen Charakterisierung des *OPV 5* zusammen mit der Herstellung und der Optimierung der *PVC*-Folien für die Folien-Zugexperimente. Zusätzlich wurden die Fluoreszenz Messungen am Fluoreszenzaufbau und deren Auswertung zu 50 % von mir und zu 50 % von Stefan Marawske^a durchgeführt. Die oben erwähnte Veröffentlichung [40] wird nicht in deutsche Sprache übersetzt, sondern als eigenständiges Kapitel in diese Arbeit eingefügt (Anhang Manuskripte). Die Zusammenfassung der Veröffentlichung zusammen mit den Teilen der Arbeit, die nicht in die Veröffentlichung eingeflossen sind, sind zusätzlich in deutscher Sprache in den Kapiteln 3.1.2-3.1.5 zu finden.

^a S. Marawske
AG Prof. Dr. C.A.M. Seidel
Lehrstuhl für Molekulare
Physikalische Chemie
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstr. 1,
40225 Düsseldorf

^b D. Schmitz
AG Prof. Dr. H. Ritter
Lehrstuhl für Präparative
Polymerchemie
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstr. 1,
40225 Düsseldorf

^c Dr. A. Koslowski
AG Prof. Dr. W. Thiel
Max-Planck-Institut für
Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1,
45470 Mülheim an der Ruhr

3.1.2 Einleitung

Die Verwendung von Oligophenylenvinylen (*OPV*) Derivaten als Deformationssensoren in einer Polymermatrix wurde bereits durch die Gruppe von Christoph Weder [12-18, 48] demonstriert. Ein Oligophenylenvinylen bestehend aus drei Phenylringen wurde hierfür in einer Polymethylmethacrylat-Matrix mit einer Konzentration von über 1000 ppm gelöst, so dass *OPV*-Excimere gebildet werden können. Bei Deformation oder Erhitzen der Polymermatrix dissoziieren die *OPV*-Excimere auseinander, dadurch wird eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften initiiert. In Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit ein Fünfring *OPV* (*OPV 5*) in einer Polyvinylchlorid-Matrix eingesetzt. Durch sterisch anspruchsvolle Heptylreste am jeweils zweiten und vierten Phenylring waren die Phenylringe im Grundzustand des *OPV 5*-Moleküls um etwa 40 ° gegeneinander verdreht. Im ersten angeregten Zustand waren alle Phenylringe des *OPV 5*-Moleküls fast parallel zur Molekülebene ausgerichtet [40]. Die bei einer Deformation der Matrix auftretenden mechanischen Spannungen sollten eine Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer und eine Blauverschiebung der Fluoreszenzemission durch Änderung der Verdrillung des Molekülgerüsts von *OPV 5* bewirken [40].

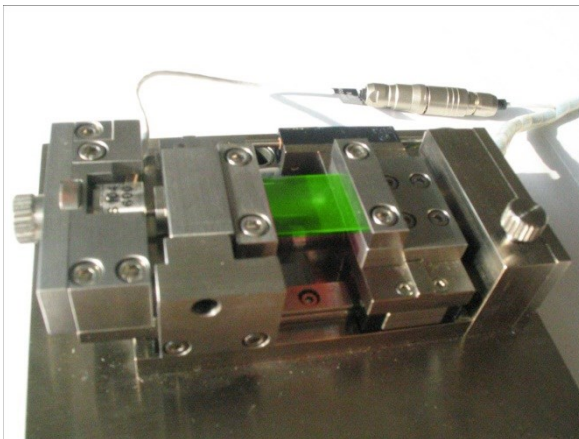


Abbildung 3.1-1 Zugvorrichtung von Deben

Die Konzentration des *OPV 5* in der *PVC*-Matrix von 0.1 ppm (100 nM, siehe Kapitel 3.1.3.3) wurde so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit für Bildung von *OPV 5*-Excimeren [49, 50] vernachlässigbar klein war (siehe Kapitel 3.1.5.1). Die mechanische Spannung wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Dehnen von *PVC*-

Folien mit Hilfe einer Zugvorrichtung (Deben, MTEST 200 siehe Abbildung 3.1-1) erzeugt.

Passend für die Zugvorrichtung wurden mit *OPV 5* dotierte *PVC*-Folien (Herstellung der Folie siehe Kapitel 3.1.3.3) in 2 cm lange und 1 cm breite Streifen geschnitten. Eine zusätzliche Verjüngung in der Mitte der Streifen sollte sicherstellen, dass die maximale Zugspannung in dem Bereich anlag, wo die Fluoreszenzmessungen stattfanden (siehe Abbildung 3.1-2).

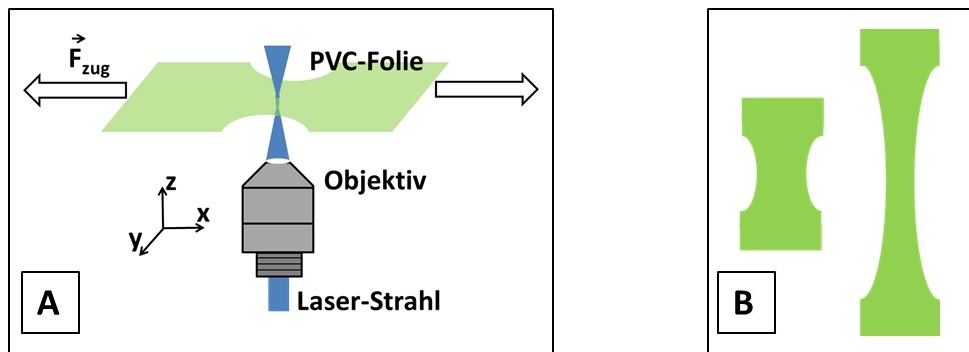


Abbildung 3.1-2 A, schematische Darstellung des Folienzugexperiments Die Zugkraft F wurde mittels einer Zugvorrichtung (Deben, MTEST 200 Abbildung 3.1-1) auf die Folie ausgeübt, dabei wurde die Fluoreszenz mittels eines selbstgebaute Fluoreszenzaufbaus (Abbildung 2.3-1 [40]) gemessen. B, schematische Darstellung der *PVC*-Folienstreifen bevor (linke Folienstreifen) und nach einem (rechte Folienstreifen) Folienzugexperiment.

Während sich die Folienstreifen unter Zugspannung ausdehnten, wurden die Fluoreszenzeigenschaften der Folien mittels des im Kapitel 3.1.3.1 beschriebenen Fluoreszenzaufbaus gemessen [40]. Um Effekte der Photozerstörung zu minimieren, wurde zusätzlich während der Dauer einer Fluoreszenzmessung (60 sec) ein $98 \times 98 \mu\text{m}$ große Bereich der Folie mit Hilfe eines Piezo-Scanners (Physik Instrumente, P-227) gescannt.

Um den mechanischen Effekt der *PVC*-Matrix auf die Fluoreszenzeigenschaften des *OPV 5* von allen anderen eventuellen Effekten der Matrix zu unterscheiden, wurden zusätzliche Referenzmessungen mit *Rhodamin 123* (*Rh 123*) dotierten *PVC*-Folien durchgeführt, wobei der Farbstoff *Rh 123* aufgrund seiner Löslichkeit im *PVC* und seines starren, nicht verdrehten Molekulargerüsts ausgewählt wurde.

3.1.3 Methoden

3.1.3.1 Kombinierte Folien-Zugexperimente (Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 1)

Die kombinierten Folien-Zugexperimente wurden an einer modifizierten Version des Fluoreszenzaufbaus (Abbildung 2.3-1) durchgeführt. Als Anregungsquelle wurde ein gepulster Dioden-Laser (*Picoquant*, $k_{rep} = 50 \text{ MHz}^1$ bei 468nm) verwendet. Das Anregungslicht wurde über einen dichroitischen Strahlteiler (*AHF*, 485 LP) in ein Wasserimmersions-Objektiv (*Olympus UPLAPO 60 NA = 1.2*) eingekoppelt. Der Fluoreszenzstrahl wurde mit einem Polarisationssteiler in zwei Polarisations Ebenen (parallel und senkrecht zur Polarisations Ebene des Anregungslichts) getrennt. Jede der Polarisations Ebenen wird wiederum mit einem Strahlteiler (*AHF*, BS560) in spektrale Fenster grün (487-548 nm mit zusätzlichem Filter, (*AHF*, HQ 520/66)) und rot (548-645 nm mit zusätzlichem Filter, (*AHF*, HQ 580/130)) aufgeteilt. Für die beiden grünen Detektionsfenster wurden zwei MPD- (*Micro Photon Devices PDM 50CT*) und für die roten Detektionsfenster zwei Perkin-Elmer-Einzelphotonendetektoren (*SPCM-AQR-14*) verwendet. Die Signale der Detektoren werden von zwei unabhängigen PC-Karten (*SPC-150*, Becker & Hickl) verarbeitet.

3.1.3.2 Herstellung von PVC-Folien für PVC-Untergrundmessungen

0.3 g PVC-Pulver wurde in 5 mL Tetrahydrofuran (*THF*) aufgelöst. Danach wurde das *THF* in einer Petrischale bei 35° C verdampft, und die entstandene Folie 8 h. unter Hochvakuum getrocknet.

3.1.3.3 Herstellung von PVC-Folien für Folienzugexperimente

0.3 g PVC-Pulver wurden zusammen mit 0.045 g Weichmacher Hexamol[®] in 5 mL Tetrahydrofuran (*THF*) aufgelöst. Danach wurden 0.5 g Aktivkohle dazugegeben und die Lösung 10 min geschüttelt. Die Lösung wurde mittels Dekantieren von der Aktivkohle grob gereinigt, anschließend wurde verbleibende Aktivkohle mittels einer Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 R) bei 4300 rpm sedimentiert und die Lösung

¹ Für die Referenzmessungen mit *Rhodamin 123* wurde die Repetitionsrate des Lasers auf $k_{rep} = 25 \text{ MHz}$ verringert.

erneut dekantiert. Zur gereinigten *THF-PVC* Lösung wurde 21.5 ng (21.4 pmol) Farbstoff *OPV 5* hinzugegeben. Das THF wurde in einer Petrischale bei 35° C verdampft. Danach wurde die entstandene Folie 8 h unter Hochvakuum getrocknet. Die Mengen aller Substanzen wurden so gewählt, dass eine 50 µm dicke *PVC*-Folie mit 100 nM *OPV 5* und 15 % Gew. Hexamol® entstand. Die Glasübergangstemperatur, der auf dieser Weise hergestellten Folien, betrug 46 °C (gemessen mittels Differenzkalorimetrie).

Anmerkung zur Aktivkohle:

Weil der feine Aktivkohlestaub sich nicht sedimentieren lies und die hochviskose *THF-PVC* Lösung kein Einsatz von feinen Filtern erlaubte, war es notwendig, grobkörnige Aktivkohle (Korndurchmesser ~ 1.5 mm) zu verwenden. Zusätzlich musste das Aktivkohlegranulat mittels Druckluft vorsichtig vom feinen Aktivkohlestaub befreit werden. Das Schütteln der Lösung mit der Aktivkohle musste sehr vorsichtig erfolgen damit durch Reiben des Granulats kein zusätzlicher Aktivkohlestaub entstand.

3.1.3.4 Reduzierung des Fluoreszenzhintergrunds der Folien

Tabelle 3.1-1 Untergrundmessungen von 4 verschiedenen *PVC*-Proben.

Nr.	<i>Sigma-Aldrich</i> Bezeichnung	<i>Sigma-Aldrich</i> Produktnummer	norm. Untergrundzählrate ^a
1	<i>PVC</i> $M_n \sim 99000$ g/mol	346764	^b
2	<i>PVC high mol. weight</i>	81387	2.2
3	<i>PVC low mol. weight</i>	81388	0.26
4	<i>PVC</i> $M_n \sim 47000$ g/mol	389323	0.25
4.1	<i>PVC</i> $M_n \sim 47000$ g/mol + 100 nM <i>OPV 5</i>		1

^a die Untergrundmessungen wurden an verschiedenen Tagen mit voneinander abweichenden Anregungsleistungen gemessen, deswegen wurden alle Untergrundzählraten auf die Zählrate von mit *OPV 5* (100nM) dotierten *PVC* Folie normiert.

^b Die Untergrundzählrate dieser Probe war zu hoch (>500kHz), um sie auf dem Fluoreszenzaufbau messen zu können.

Die Fluoreszenzmessungen von 0.1 ppm (100 nM) des *OPV 5* in *PVC* stellen hohe Anforderungen an die Reinheit des *PVC*. Um für Fluoreszenzmessungen geeignetes *PVC* zu finden, wurden vier verschiedene *PVC*-Typen auf ihren Fluoreszenzuntergrund getestet. Die Untergrundmessungen wurden auf dem Fluoreszenzaufbau (siehe Abbildung 2.3-1) durchgeführt [40]. Für die Untergrundmessungen wurden 50 µm dicke *PVC*-Folien aus reinem *PVC* hergestellt. Die gemessenen Untergrundzählraten sind in der Tabelle 3.1-1 zusammengefasst. Für die kombinierte Fluoreszenz- und Zugexperimente wurde das *PVC* mit der niedrigsten Untergrundzählrate (*PVC* Nr 4 Tabelle 3.1-1) verwendet. Die

Untergrundzählrate einer reinen *PVC*-Probe kann nur durch Raman-Streuung entstehen und muss damit sehr kurze Abklingzeit haben (im Bereich der Geräteantwortfunktion der Detektoren). Die Abklingzeit des Untergrundsignals der *PVC*-Probe Nr. 4 lag im Bereich von 3 ns, demzufolge muss die Ursache für das Untergrundsignal die Verunreinigungen des *PVC* sein.

Tabelle 3.1-2 Untergrundmessungen von über Aktivkohle gereinigten *PVC*-Probe (*PVC* Nr 4 Tabelle 3.1-1).

	<i>norm. Signal</i>
<i>ungereinigt</i>	<i>0.25</i>
<i>über Aktivkohle gereinigt</i>	<i>0.06</i>
<i>über Aktivkohle gereinigt</i> <i>+ 100nM OPV5</i>	<i>1</i>

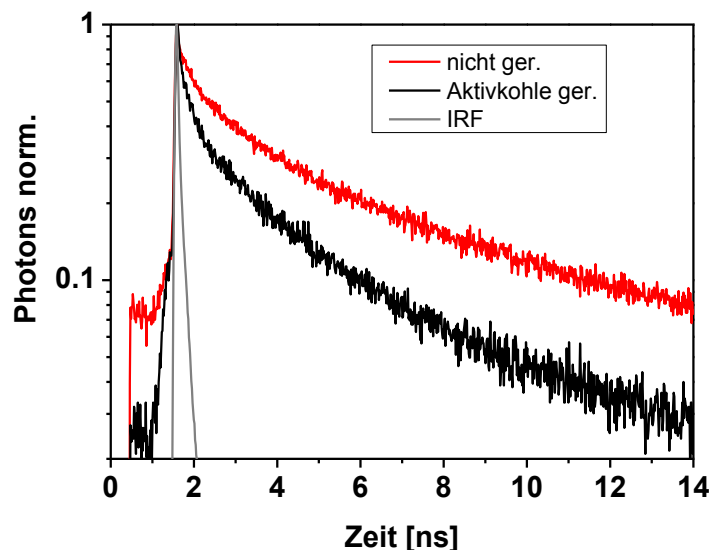


Abbildung 3.1-3 Abklingkurven des Untergrundsignals des *PVC*. Rot ist eine ungereinigte *PVC*-Probe (Tabelle 3.1-1 Nr 4), schwarz ist eine mit Aktivkohle gereinigte *PVC*-Probe (Tabelle 3.1-1 Nr 4), grau ist die Geräte-Antwortfunktion.

Um den Anteil der Verunreinigungen und damit auch die Untergrundzählrate des *PVC* zu reduzieren, wurde die für die Folienherstellung zubereitete *THF-PVC* Lösung mit Hilfe der gekörnten Aktivkohle gereinigt (siehe Kapitel 3.1.3.3), was die Untergrundzählrate der *PVC*-Folie um mehr als Faktor 4 reduzierte (Tabelle 3.1-2).

3.1.3.5 Umrechnung der Zugkraft in Zugspannung bei *PVC*-Folien

Um voneinander abweichende Ausmaße der einzelnen Folienstreifen Rechnung zu tragen, wurde die Zugkraft in eine mittlere Zugspannung σ_N umgerechnet (Gleichung 3.1-1).

$$\sigma_N(t) = \frac{F_{zug}}{A_q(t)} \quad 3.1-1$$

$$A_q(t) = A_{q0} - (A_{q0} - A_{qE})\Delta l_r(t) \quad 3.1-2$$

$$\Delta l_r(t) = \frac{l(t)}{l_E - l_0} \quad 3.1-3$$

Δl_r = relative Ausdehnung der Folie

σ_N = Zugspannung

F_{zug} = Zugkraft

$A_q(t)$ = Querschnittsfläche zum Zeitpunkt t

A_{q0} = Querschnittsfläche vor dem Zugexperiment

A_{qE} = Querschnittsfläche am Ende des Zugexperiments

$l(t)$ = Länge der Folie zum Zeitpunkt t

l_0 = Länge der Folie vor dem Zugexperiment

l_E = Länge der Folie am Ende des Zugexperiments

Die Länge einer Folie konnte mittels Software Mikrotest (Deben) zu jedem Zeitpunkt mit einer Genauigkeit von $\pm 1 \mu\text{m}$ ($\sim 0.01\%$ der Folienlänge) bestimmt werden. Die minimale und maximale Längen der Folie entsprachen den minimalen und maximalen Abständen zwischen den Halteklammern der Zugvorrichtung und betrugen damit 10.5 mm bzw. 20 mm. Die Dicke der Folie konnte mittels eines konfokalen Scans unter Verwendung des Piezoscanners am Fluoreszenzaufbau mit einer Genauigkeit von $< 1 \mu\text{m}$ ($\approx 1\%$ der der Foliendicke) bestimmt werden. Die Bestimmung der Breite der Folie erfolgte vor und nach einem Zugexperiment. Die Folienbreite konnte mittels einer Schieblehre mit einer Genauigkeit von $\approx 0.5 \text{ mm}$ ($\approx 12\%$ der Folienbreite) bestimmt werden.

3.1.3.6 Viskoelastizität einer PVC-Folie

In den Zugexperimenten mit der Zugvorrichtung rissen die $50 \mu\text{m}$ dicken *PVC*-Folien bei einer Zugspannung im Bereich von $10\text{--}40 \text{ N/mm}^2$ und einer relativen Ausdehnung von $\Delta l_r \leq 0.5$. (in der Literatur angegebene Zugfestigkeit und Dehnbarkeit von *PVC* liegt bei $\sigma_N = 50 \text{ N/mm}^2$ bzw. bei $\Delta l_r = 0.5$ [51], $\Delta l_r = 0.5$ entspricht dabei Ausdehnung auf 150% der ursprünglichen Länge (siehe Gleichung 3.1-3)).

Für die Herstellung der Folien wurde *PVC* mit einer mittleren Molmasse von $M_n = 47000 \text{ g/mol}$ (Fluka) und einer Dichte von $\rho \approx 1.4 \text{ g/cm}^3$ verwendet. Mit Hilfe der mittleren Molmasse lassen sich das beanspruchte Volumen und damit auch der mittlere Querschnitt und der mittlere Radius eines *PVC*-Moleküls abschätzen:

$$V_{mol} = \frac{M_n}{\rho_{PVC} \cdot N_A} = \frac{47000 \cdot [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]}{1.4 [\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}] \cdot 6.022 \cdot 10^{23} \cdot [\text{mol}^{-1}]} = 5.6 \cdot 10^{-26} \cdot [\text{m}^3] \quad 3.1-4$$

$$A_{qmol} = \left(\sqrt[3]{\frac{3 \cdot V_{mol}}{4 \cdot \pi}} \right)^2 \cdot \pi = 1.8 \cdot 10^{-17} \cdot [\text{m}^2]$$

$$r_{mol} = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot V_{mol}}{4 \cdot \pi}} = 2.4 \cdot 10^{-9} \cdot [\text{m}]$$

V_{mol} = Volumen eines Moleküls

A_{qmol} = Querschnittsfläche eines Moleküls

r_{mol} = Radius des Moleküls

ρ_{PVC} = Dichte des *PVC*

N_A = Avogadro-Konstante

M_n = Mittleres Molvolumen

Aus dem mittleren Querschnitt der *PVC*-Knäuel lässt sich die maximale Zugspannung pro *PVC*-Molekül von $\sigma_{Nmol} = 80 \text{ pN/PVC-Molekül}$ berechnen. Bei einem mittleren Molekülknäuel Radius von 2.4 nm und einer mittleren Kettenlänge von etwa 190 nm muss jedes *PVC*-Molekül ungefähr zehnmal gefaltet werden, um ein Knäuel zu bilden. Dadurch beträgt die rechnerisch maximale Zugfestigkeit des *PVC* ungefähr 8 pN/(C-C Einfachbindung), was deutlich unter der in der Literatur angegebenen Zugfestigkeit einer kovalenten C-C Bindung von 4 nN [52, 53] liegt. Zusätzlich wird aus dem Verhältnis von der mittleren Kettenlänge des *PVC* zum mittleren Knäuel-Durchmesser die maximale Ausdehnung berechnet, so ergäbe sich die maximale Dehnbarkeit mit $\Delta l_r \leq 40$, die ungefähr 80-mal über der gemessenen Dehnbarkeit liegt. Beides, die schlechte Dehnbarkeit zusammen mit der niedrigen Reißfestigkeit, können auf die eingeschränkte Beweglichkeit von *PVC* Molekülen untereinander (Glasübergangstemperatur von *PVC* $T_g = 80 \text{ °C}$ [54]) zurückgeführt werden.

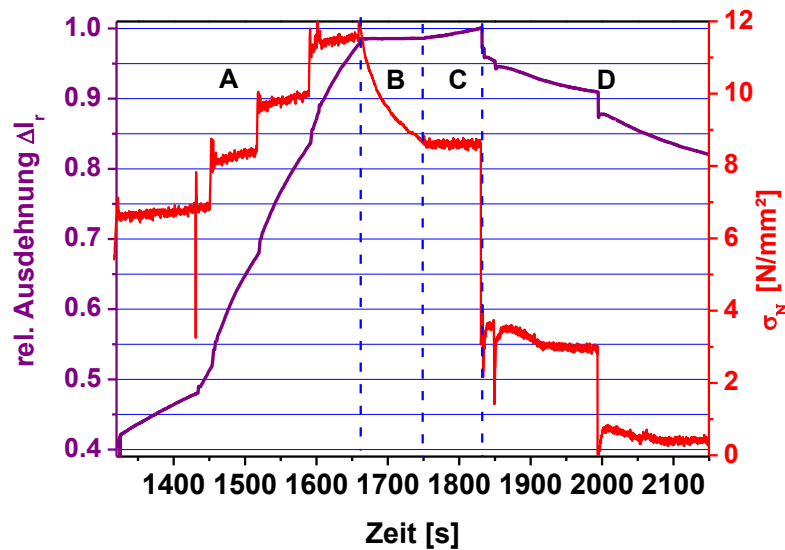


Abbildung 3.1-4 Zugspannung und Dehnung einer Folie während eines Folienzugexperiments. Im Abschnitt A und C wird die Zugkraft bei einem hohen Wert konstant gehalten, indem die Zugvorrichtung den Abstand zwischen den Halteklammern dynamisch an die Ausdehnungsgeschwindigkeit der Folie anpasst (Plastizität). Im Abschnitt B wird der Abstand zwischen der Halteklammern bei hohen Zugspannung konstant gehalten, die Folie gibt dabei langsam nach, die Zugspannung wird dabei kontinuierlich kleiner (Plastizität). Im Abschnitt D wird die Zugkraft aktiv reduziert, die Folie verkürzt sich dabei (Elastizität).

Bei geringer Molekülbeweglichkeit entstehen lokal begrenzte Bereiche mit sehr hoher Zugspannung, die zum vorzeitigen Reißen des *PVC* führen. Zusätzlich führt die ungleichmäßige Verteilung der Zugspannung dazu, dass sich die begrenzten Bereiche mit abweichenden optischen Eigenschaften (Pseudobrüche) ausbilden [51]. Diese Pseudobrüche führen zur Trübung der Folien bei einer Zugspannung von $\sigma_N \leq 5 \text{ N/mm}^2$. Für die kombinierten Folienzug-Fluoreszenzexperimente musste sowohl das vorzeitige Abreißen als auch die Trübung der Folien verhindert werden. Dafür wurde dem *PVC* der Weichmacher *Hexamol*® (BASF) zugesetzt. Die *PVC*-Folien mit 15 % Gew. des Weichmachers und einer Glasübergangstemperatur von $T_g = 46 \text{ °C}$ erwiesen sich am geeignetsten für die kombinierte Fluoreszenz-Zugexperimente.

Der Weichmacher verringert die Van-Der-Waals-Kräfte zwischen den *PVC*-Molekülen und erhöht damit die Beweglichkeit der *PVC*-Moleküle untereinander, was eine bessere Dehnbarkeit des *PVC* zufolge hat. Die mit 15 % *Hexamol*® versetzten *PVC*-Folien könnten sich unter Zugbelastung bis zu einer maximalen relativen Ausdehnung von $\Delta l_r = 2$ ausdehnen, wobei mit steigender Zugkraft die Ausdehnungsgeschwindigkeit der Folien zunahm (Abbildung 3.1-4 Abschnitt A).

Dies hatte zu Folge, dass die maximalen Zugspannungen bei den Folienzugexperimenten an mit 15% *Hexamol*® versetzten *PVC*-Folien im Bereich von $\sigma_N = 10\text{-}20 \text{ N/mm}^2$ ($\sigma_{\text{Nmol}} = 20\text{-}40 \text{ pN/PVC-Molekül}$) lag. Die Dehnbarkeit der Folien bewirkte auch, dass bei einer konstant gehaltenen relativen Ausdehnung der Folie sich die Zugspannung von selbst abgebaut hat (Abbildung 3.1-4 Abschnitt B). Zusätzlich erzeugte die kleinere Entropie der ausgestreckten *PVC*-Moleküle in der gedehnten Folien einer der Zugkraft entgegenwirkenden elastischen Kraft. Beim plötzlichen Verringern der angelegten Zugkraft führte die elastische Kraft zu einer langsamen Verkürzung (Fließgeschwindigkeit $\approx 0.5 \text{ }\mu\text{m/s}$) der zuvor gedehnten und mit 15 % *Hexamol*® versetzten *PVC*-Folien (Abbildung 3.1-4 Abschnitt D). Beide, die Elastizität und die Plastizität der mit 15% *Hexamol*® versetzten *PVC*-Folien, führten dazu, dass der Abstand zwischen den Halterklammern dynamisch an die Fließgeschwindigkeit der Folie angepasst werden musste, um die angelegte Kraft konstant zu halten (Abbildung 3.1-4 Abschnitt A und C).

3.1.4 Ergebnisse

3.1.4.1 Spektroskopische Charakterisierung von OPV 5

Tabelle 3.1-3 Spektroskopische Eigenschaften von OPV 5 (Anisotropie r , Lebensdauer τ_F , Emissionsmaximum $\lambda_{F(max)}$) des Farbstoffes OPV 5 in THF Triacetin und PVC-Folie (ohne Zugspannung).

	$\tau_{F(av)}^3 [ns]$	$\lambda_{F(max)} [nm]$	r	Φ_F	$\epsilon [cm^{-1}mol^{-1}]$
THF ¹	0.78 ⁴	485 ⁶	0.17 ⁵	0.53 ⁸	83000 ¹⁰
PVC-Folie.	1.03 ⁵	492 ⁶	$\approx 0.39^{5,7}$	0.81 ⁹	
Triacetin ²		484 ⁶	0.39 ^{6,7}		

¹ Die Viskosität von THF ist 0.47 mPa s [55]

² Die Viskosität von Triacetin ist 16 mPa s [56]

³ Die Fluoreszenzlebensdauer von OPV 5 hatte zwei Komponenten, der angegebener Wert entspricht dem fluoreszenzgewichteten Mittelwert der beiden Komponenten

$$\tau_{F(av)} = (A_1 \cdot \tau_1^2 + A_2 \cdot \tau_2^2) / (A_1 \cdot \tau_1 + A_2 \cdot \tau_2).$$

⁴ Diese Messungen wurden am Spektrometer 5000 U (IBH) (siehe Kapitel 2.2) durchgeführt.

⁵ Diese Messungen wurden am Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 1 (siehe Kapitel 3.1.3.1) durchgeführt.

⁶ Diese messungen wurden am Spektrometer FluoroLog-3 (Jobin Yvon Horiba) durchgeführt (siehe Kapitel 2.2)

⁷ Die Fluoreszenzanisotropie r ist in den Fällen gleich der fundamentalen Anisotropie r_0 . Wie im Kapitel 1.1.4 dargelegt hängt die Fluoreszenzanisotropie r von der fundamentalen Anisotropie r_0 , der Rotationkorrelationszeit ρ und der Fluoreszenzlebensdauer τ_F ($\tau_F \approx 0.8$ ns) des Fluorophors (Gleichungen 1.1-15 und 1.1-16). Bei hoher Viskosität des Lösungsmittels geht die Rotationskorrelationszeit laut Gleichung 1.1-15 gegen unendlich und r geht gegen r_0 .

⁸ Referenz Rh 110 in Wasser mit einer Quantenausbeute von 89%

⁹ siehe [40]

¹⁰ gemessen am Cary-300 bei 432 nm (siehe Kapitel 2.1)

3.1.4.2 Folienzug- und Fluoreszenzmessungen

Bei Anlegen einer Zugspannung dehnten sich die PVC-Folien aufgrund ihrer Plastizität kontinuierlich aus, wobei die Ausdehnungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Zugspannung verlief. Wurde die anliegende Zugspannung bei bereits gedehnten PVC-Folien reduziert, so wurde aufgrund der Elastizität eine schwache Kontraktion der Folie beobachtet (Abbildung 3.1-5). Weitere Details zur Plastizität und der Elastizität der Folie sind im Kapitel 3.1.3.6 beschrieben.

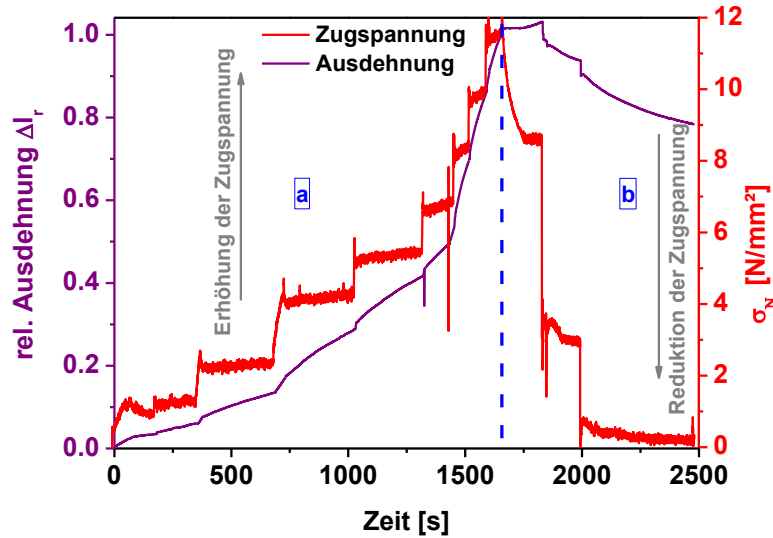


Abbildung 3.1-5 Die Zugspannung σ_N (rote Kurve) und die relative Ausdehnung Δl_r (lila Kurve, def. von Δl_r siehe Gleichung 3.1-3) einer *PVC*-Folie im Verlauf eines Folienzugexperiments. Im Teilbereich *a* und *b* findet schrittweise ein Aufbau bzw. Abbau der Zugspannung (Plateaus auf der roten Kurve) statt.

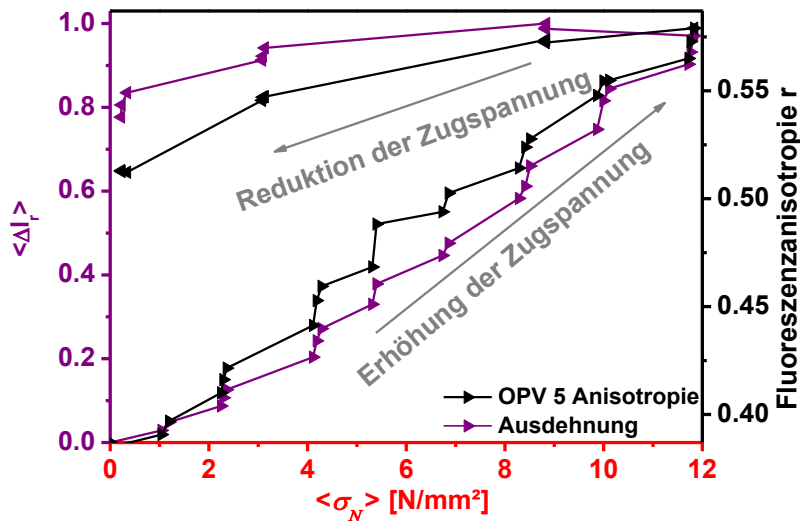


Abbildung 3.1-6 Die Fluoreszenzanisotropie (r) (schwarze Punkte) des *OPV 5* in *PVC*-Folie und die relative Ausdehnung der *PVC*-Folie (lila Punkte) in Abhängigkeit von der Zugspannung dargestellt. Die einzelnen Punkte auf dem Bild repräsentieren die Mittelwerte der Zugspannung $\langle \sigma_N \rangle$ und der relativen Ausdehnung $\langle \Delta l_r \rangle$ über die Dauer der Fluoreszenzmessungen ($\Delta t_F = 1$ min).

Parallel zur Ausdehnung der *PVC*-Folie ändert sich bei *Rh 123* und bei *OPV 5* dotierten *PVC*-Folien die Fluoreszenzanisotropie (Abbildung 3.1-6, Abbildung 3.1-9). Bei maximaler Ausdehnung der Folien wurde eine deutlich größere maximale Erhöhung der Fluoreszenzanisotropie von 50% bei den *OPV 5*

dotierten *PVC*-Folien im Vergleich zu der maximalen Erhöhung der Fluoreszenz-anisotropie von 18% bei den *Rh 123* dotierten *PVC*-Folien beobachtet.

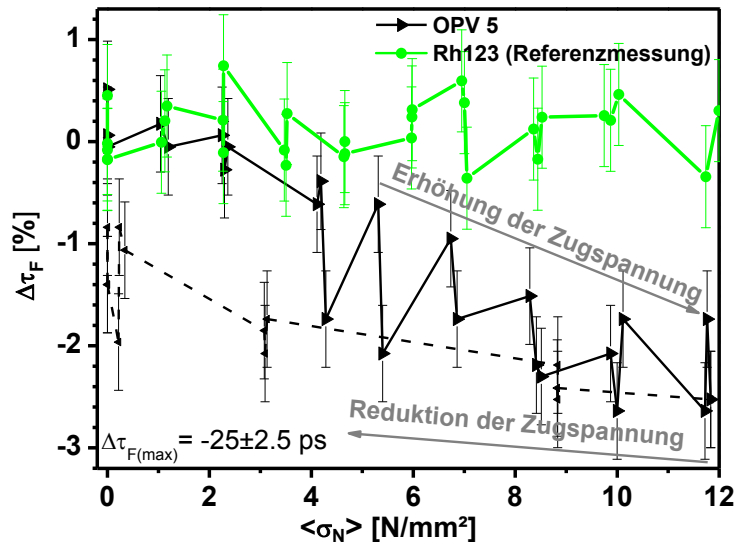


Abbildung 3.1-7 Änderung der Fluoreszenzlebensdauer (τ_F) von *OPV 5* dotierten *PVC*-Folien in Abhängigkeit von der Zugspannung, die Fehlerbalken repräsentieren statistisches Photonenrauschen. Die hellgrünen Punkte in beiden Graphen zeigen eine Referenzmessung von mit *Rh 123* dotierten *PVC*-Folien.

Aufgrund der Plastizität der Folie änderte sich die Zugspannung fortwährend, deswegen wurde für die Erstellung der beiden Graphen ein Mittelwert der Zugspannung $\langle\sigma_N\rangle$ über die Dauer der Fluoreszenzmessungen (jeweils 1 min) verwendet (vergl. Abbildung 3.1-5).

Während Anisotropieänderungen bei beiden Farbstoffen in der *PVC*-Folie auftraten, wurde zusätzlich eine Blauverschiebung der Fluoreszenzemission (Abbildung 3.1-8) von maximal 1 nm und eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer von maximal 25 ps (Abbildung 3.1-7) nur bei *OPV 5* dotierten *PVC*-Folien beobachtet. Bei der plastischen Kontraktion der *PVC*-Folien konnte eine partielle Reversibilität der Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften festgestellt werden. Die absoluten Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften sind in der Tabelle 3.1-4 zusammengefasst.

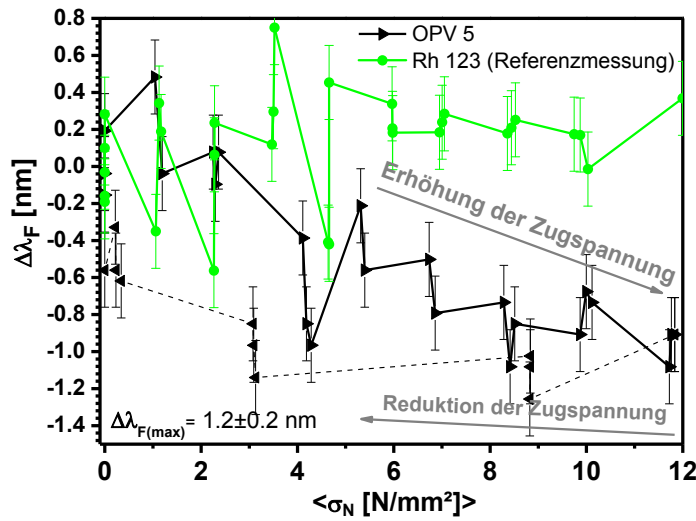


Abbildung 3.1-8 Die Blauverschiebung der Fluoreszenzemission $\Delta\lambda_F$ von *OPV 5* dotierten PVC-Folien in Abhängigkeit von der Zugspannung, die Fehlerbalken repräsentieren statistisches Photonenrauschen. Die hellgrünen Punkte in beiden Graphen zeigen eine Referenzmessung von mit *Rh 123* dotierten PVC-Folien.

Aufgrund der Plastizität der Folie änderte sich die Zugspannung fortwährend, deswegen wurde für die Erstellung der beiden Graphen ein Mittelwert der Zugspannung $\langle\sigma_N\rangle$ über die Dauer der Fluoreszenzmessungen (jeweils 1 min) verwendet (vergl. Abbildung 3.1-5).

Tabelle 3.1-4 Fluoreszenzlebensdauer (τ_F), Fluoreszenzemission (λ_F) und Fluoreszenzanisotropie (r) von mit *OPV 5* und *Rh 123* dotierten PVC-Folien. Die Unsicherheiten der einzelne Werte resultieren aus dem statistischen Photonenrauschen, wobei bei der Fluoreszenzanisotropie dieser Unsicherheit vernachlässigbar klein ($\approx 0.25\%$) ist.

<i>OPV 5 dotierte PVC-Folie</i>			
	$\tau_F [ps]$ ($\Delta\tau_F [\%]$) ^a	$\lambda_F [nm]$ ($\Delta\lambda_F [\%]$) ^a	r ($\Delta r [\%]$) ^a
<i>vor dem Zugexp.</i>	1030 ± 2.5	492 ± 0.2	0.39
<i>bei max. Zugspannung von 12 N/cm²</i>	978 ± 2.5 (-2.5)	491 ± 0.2 (-0.2)	0.58 (49)
<i>nach dem Zugexp.</i>	1020 ± 2.5 (-1.0)	491.6 ± 0.2 (-0.08)	0.51 (32)
<i>Rh 123 dotierte PVC-Folie</i>			
<i>vor dem Zugexp.</i>	3125 ± 8	524.5 ± 0.2	0.39
<i>bei max. Zugspannung von 23 N/cm²</i>	3125 ± 8	524.5 ± 0.2	0.45 (18)
<i>nach dem Zugexp.</i>	3125 ± 8	524.5 ± 0.2	0.43 (11)

^aDie Änderungen sind auf die Fluoreszenzeigenschaften einer nicht gedehnten PVC-Folie bezogen

3.1.5 Diskussion der Ergebnisse

3.1.5.1 OPV 5-Excimeren in PVC-Folien

Die Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften des *OPV 5* die bei der Verformung der Folien gemessen werden konnten, sind kleiner die zu erwartende Änderungen der gleichen Eigenschaften, die aufgrund von Assoziation bzw. Dissoziation von *OPV*-Excimeren auftreten können[13, 48]. Aus diesem Grund wird hier kurz erläutert warum die beobachteten Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften nicht auf das Vorhandensein von *OPV*-Excimeren in den Folien zurückgeführt werden können.

Die Bildung von *OPV*-Excimeren in Polymerfolien erfordert eine Konzentration des Farbstoffs von mehr als 0.0l Gew.-% [13, 48]. Bei allen Experimenten mit *OPV 5* dotierten Folien wurde eine deutlich niedrigere Konzentration des *OPV 5* in der *PVC*-Matrix von 0.1 ppm (100 nM, siehe Kapitel 3.1.3.3) eingesetzt. Deswegen kann die Wahrscheinlichkeit für Bildung von *OPV 5*-Excimeren bei den Folienzugexperimenten als vernachlässigbar klein betrachtet werden. Zusätzlich lag die Fluoreszenzanisotropie der nicht gedehnten mit *OPV 5* dotierten *PVC*-Folien bei $r = 0.39$ (Tabelle 3.1-4), dies entspricht der fundamentalen Fluoreszenzanisotropie r_0 des *OPV 5*, die in Triacetin gemessen wurde (Tabelle 3.1-3). Bei Vorhandensein von Excimeren, wie sie in der Arbeitsgruppe von Christoph Weder beobachtet wurden [13, 48], müsste aufgrund des Energietransfers zwischen den *OPV 5*-Molekülen eine kleinere Fluoreszenzanisotropie gemessen werden.

3.1.5.2 Vergleich der Reversibilität der Änderung der Fluoreszenzanisotropie zur Reversibilität der Änderung der Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenz-emission

Die beobachtete Reversibilität der Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften hängt mit der Beweglichkeit der farbstoffumgebenden Matrixmoleküle zusammen, weil die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften entweder eine Änderung der räumlichen Ausrichtung oder eine Änderung der geometrischen Form des Moleküls nach sich zieht. Um die aufgetretenen Reversibilitäten der Fluoreszenzeigenschaften mit

einander zu vergleichen, wurden relative Reversibilitäten nach Gleichung 3.1-5 ausgerechnet und in Tabelle 3.1-5 zusammengefasst.

$$\Delta_r x = \left| \frac{\Delta x_{\max} - \Delta x_{\text{rück}}}{\Delta x_{\max}} \right| \quad 3.1-5$$

$\Delta_r x$ = relative Reversibilität der Fluoreszenzeigenschaft x

$\Delta x_{\max}$ = Änderung der Fluoreszenzeigenschaft x bei maximalen Zugspannung

$\Delta x_{\text{rück}}$ = Änderung der Fluoreszenzeigenschaft x nach dem die Zugspannung wieder auf 0 N/mm² reduziert wurde

Wie bereits im Kapitel 1.1.4 dargelegt, hängt die Fluoreszenzanisotropie zum einen von den fundamentalen Eigenschaften des Fluorophors und zum anderen von der Wechselwirkung zwischen der räumlichen Orientierung der Farbstoffe mit der räumlichen Orientierung der Matrixmoleküle zusammen.

Tabelle 3.1-5 Relative Reversibilität Δ_r (siehe Gleichung Gleichung 3.1-5) der Fluoreszenzlebensdauer τ_F , Lage des Fluoreszenzemissionsmaximums λ_F und der Fluoreszenzanisotropie r von *OPV 5* oder *Rh 123* dotierten *PVC*-Folien. Die Unsicherheiten der einzelnen Werte resultieren aus dem statistischen Photonenrauschen.

	$\Delta_r(\tau_F) [\%]$	$\Delta_r(\lambda_F) [\%]$	$\Delta_r(r) [\%]$
<i>OPV 5</i>	56 ± 6	60 ± 6	35 ± 6
<i>Rh 123</i>	keine Änderung	keine Änderung	34 ± 6

Bei der Berechnung der relativen Reversibilität der Fluoreszenzanisotropie heben sich durch die Normierung auf die gesamte Änderung der Fluoreszenzanisotropie die Effekte der Molekülform und der Ausrichtung des Übergangsdipolmoments bezüglich der Molekülachsen auf, so dass nur der Effekt der Ausrichtung der Matrixmoleküle übrig bleibt. Deswegen wird sowohl bei Folien mit *Rh 123* als auch bei Folien mit *OPV 5* die gleiche relative Reversibilität der Fluoreszenzanisotropie beobachtet (siehe Tabelle 3.1-5 und Abbildung 3.1-9).

Während die Änderung der Fluoreszenzanisotropie auf die Änderung der Ausrichtung der Farbstoffmoleküle zurückzuführen ist, ist für die beobachtete Änderung der Fluoreszenzlebensdauer und für die Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums eine Änderung der geometrischen Form des Molekülgerüsts notwendig [40]. Deswegen unterscheidet sich bei *OPV 5* Messungen die relative Reversibilität der Fluoreszenzanisotropie von der relativen Reversibilitäten der Fluoreszenzlebensdauer und der spektralen Verschiebung (Tabelle 3.1-5). Gleichzeitig sind die relativen Reversibilitäten der Änderung der Fluoreszenz-

lebensdauer und der Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums untereinander innerhalb der Messtoleranz gleich, weil für beide Änderungen die gleiche Änderung der geometrischen Form des Molekülgerüsts notwendig ist [40].

3.1.5.3 Fluoreszenzanisotropie

Der gleiche Effekt der Änderung der Fluoreszenzanisotropie bei der Anwendung der Zugspannung lässt sich sowohl bei *OPV 5* als auch bei *Rh 123* beobachten, wobei qualitativ die beide Farbstoffe die gleiche Abhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie von der Ausdehnung bzw. Kontraktion der *PVC*-Folie zeigen (Abbildung 3.1-9). Folglich ist der Effekt nicht auf die Verdrillung des Molekülgerüsts von *OPV 5*, sondern auf die Orientierung der Matrixmoleküle zurückzuführen [57, 58]. Bei Erhöhung der Zugspannung dehnt sich die *PVC*-Folie aufgrund ihrer Plastizität (Kapitel 3.1.3.6) aus. Dabei werden die *PVC*-Moleküle zusammen mit den Farbstoffmolekülen parallel zur Zugkraft ausgerichtet. Bei parallel zur Zugkraft ausgerichteter Polarisierung der Anregungsquelle steigt dann die Fluoreszenzanisotropie (siehe Kapitel 1.1.4 Gleichung 1.1-18). Die Fluoreszenzanisotropie wird wieder kleiner, wenn bei den bereits gedehnten Folien die Zugspannung wieder reduziert wird. Der Grund hierfür ist die Rückfaltung der zuvor langgestreckten der *PVC*-Moleküle zum statistischen Knäuel. Die Ausdehnung und Kontraktion der *PVC*-Folie wird hierbei mittels der Zugvorrichtung bestimmt (siehe Kapitel 3.1.3.5), was zu Folge hat, dass die gemessenen Werte ein Mittelwert über den gesamten Folienstreifen repräsentieren. Dagegen repräsentieren die Fluoreszenzanisotropiewerte nur ein Mittelwert für den 98 x 98 µm großen Bereich in der Mitte des Folienstreifens, wo die Fluoreszenz gemessen wird (Kapitel 3.1.2 Abbildung 3.1-2).

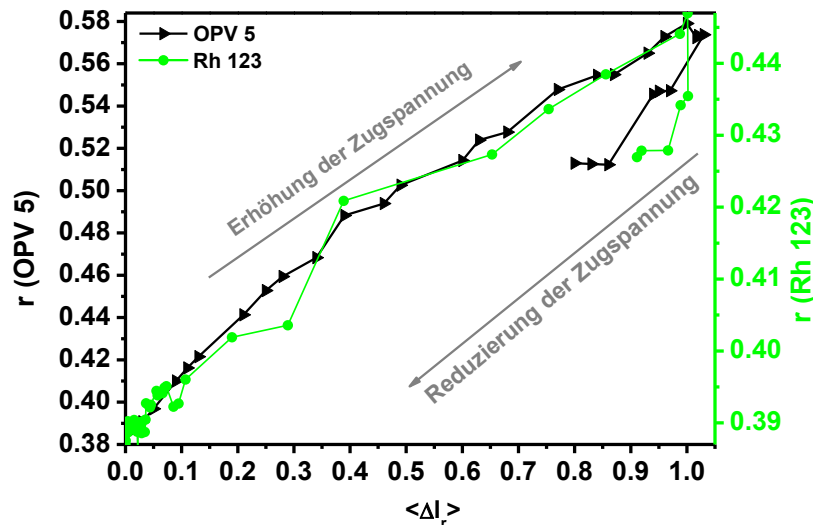


Abbildung 3.1-9 Fluoreszenzanisotropie von *OPV 5* (schwarze Kurve) und *Rh 123* (grüne Kurve) in Abhängigkeit von der Ausdehnung der *PVC*-Folie. Die beiden Fluoreszenzanisotropieverläufe wurden auf einander skaliert, wobei auf der rechten y-Achse die absoluten Werte der Fluoreszenzanisotropie des *Rh 123*, auf der linken y-Achse die absoluten Werte der Fluoreszenzanisotropie des *OPV 5* abgebildet sind.

Aufgrund der Plastizität der Folie änderte sich die Länge der Folien fortwährend, deswegen wurde für die Erstellung der beiden Graphen ein Mittelwert der relativen Ausdehnung $\langle \Delta l_r \rangle$ über die Dauer der Fluoreszenzmessungen (jeweils 1 min) verwendet (vergl. Abbildung 3.1-5).

Aufgrund der Verjüngung des Folienstreifens ist die lokale Zugspannung damit auch die lokale Ausdehnung im Bereich der Fluoreszenzmessungen größer im Vergleich zum Mittelwert über den gesamten Folienstreifen. Deswegen weicht der Verlauf der Fluoreszenzanisotropie von dem Verlauf der Folienausdehnung systematisch ab (Abbildung 3.1-6).

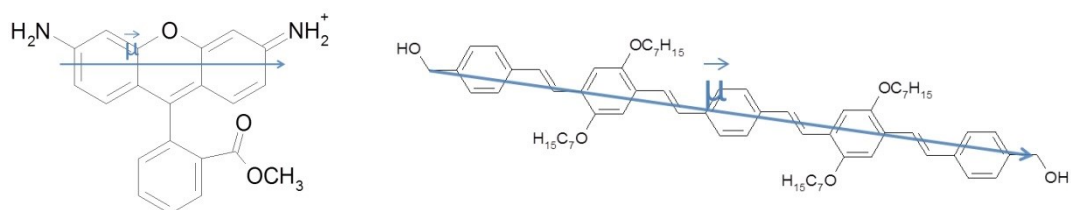


Abbildung 3.1-10 Links chemische Struktur des Farbstoffes *Rh 123*. Rechts chemische Struktur des Farbstoffes *OPV 5*. Der blaue Pfeil zeigt die Richtung des Übergangsdipolmoments für die Fluoreszenzemission an [50, 59, 60].

Die quantitativ stärkere Änderung der Fluoreszenzanisotropie der mit *OPV 5* dotierten Folien im Vergleich zu den mit *Rh 123* dotierten *PVC*-Folien (Abbildung 3.1-9) ist auf die länglichere Form von *OPV 5* (Abbildung 3.1-10) zurückzuführen.

3.1.5.4 Änderung der Fluoreszenzlebensdauer und der Blauverschiebung der Fluoreszenzemission des OPV 5

Bei den beobachteten Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer und des Fluoreszenzemissionsmaximums muss die von der Orientierung der Matrixmoleküle abhängige Änderung des Brechungsindex berücksichtigt werden.

Für *OPV 5* wird aufgrund der Änderung des Brechungsindex eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer von maximal $\Delta\tau_F = -3$ ps und eine Rotverschiebung der Fluoreszenzemission von etwa $\Delta\lambda_F = 0.15$ nm erwartet, wenn die Ausdehnung der PVC-Folie $\Delta l_r = 1^1$ beträgt [40]. Die Messungen ergaben eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer von 25 ± 2.5 ps und eine Blauverschiebung der Fluoreszenzemission von -1.2 ± 0.2 nm. Bei mit *Rh 123* dotierten *PVC*-Folie konnten keine eindeutige Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer oder Verschiebung der Fluoreszenzemission festgestellt werden, wobei die vom Brechungsindex der *PVC*-Matrix abhängigen Effekte unterhalb der durch das statistischen Photonenrauschen begrenzten Messgenauigkeit lagen. Daher bleiben bei mit *OPV 5* dotierten Folien eindeutig messbare Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer und Blauverschiebung der Emissionswellenlänge, die der mechanischen Wirkung auf das verdrillte Molekülgerüst zugeordnet werden können. Ein Vergleich zwischen den gemessenen Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften und den durch semiempirische quantenmechanische Simulation berechneten Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des *OPV 5* liefert mittlere auf die Fluorophore wirkende mechanische Spannungen im Bereich von 200-600 pN [40]

¹ $\Delta l_r = 1$ entspricht der Ausdehnung auf 200% der ursprünglichen Länge (siehe Gleichung 3.1-3).

3.2 Additive zur Steigerung der Signalstärke von Rhodamin 110

3.2.1 Vorwort

Die in diesem Kapitel präsentierten Daten sind im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 663 A8 in Zusammenarbeit mit Daniela Pfiffi entstanden. Im Rahmen des Projekts wurden sowohl *FCS*-Messungen von *Rhodamin 123* (*Rh 123*) und *Rhodamin 110* (*Rh 110*) mit verschiedenen Additiven als auch Photozerstörungsmessungen von *Rh 123* unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Daniela Pfiffi hat dabei den größten Teil der *FCS*-Messungen an *Rh 123* durchgeführt, die Auswertungen der *FCS*-Messungen des *Rh 123* sind bereits in ihrer Dissertation zusammengefasst [24]. Deswegen werden im Rahmen dieser Arbeit nur die Auswertungen der *FCS*-Messungen von *Rh 110* präsentiert. Die Messungen der Photozerstörung des *Rh 123* wurden von uns beiden zusammen durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse der Messungen der Photozerstörung sind ebenfalls in der Dissertation von Daniela Pfiffi bereits zusammengefasst. Da viele Aspekte dieser Messungen, speziell bei der Auswertung von Photozerstörungsmessungen in entgasten Lösungen dort nicht besprochen wurden, werden im Rahmen dieser Arbeit die Photozerstörungsmessungen von *Rh 123* im Kapitel 3.2.9 kurz beschrieben.

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten von *Rh 110* mit Additiv4-[(4-Aminophenyl)diazanyl]benzoesäure (*A-AZB-C*) wurden von Maximilian Mühle im Rahmen des oben genannten Projekts für seine Bachelorarbeit [61] aufgenommen. Die ihm Kapitel 3.2.7 präsentierte Auswertung dieser Daten gehörte nicht zu seiner Bachelorarbeit und wurde ausschließlich von mir durchgeführt.

3.2.2 Einleitung

Bei Anregung eines Fluorophors werden neben dem ersten angeregten Singulettzustand auch die dunklen und langlebenden Zustände wie Triplett-, Radikalkation- und Radikalanionzustände besetzt [24, 62-64], wodurch die Fluoreszenzquantenausbeute eines Fluorophors verringert wird. Zusätzlich können langlebende angeregte Zustände aufgrund ihrer chemischen Reaktivität zur Photozerstörung eines Fluorophors beitragen [65].

Speziell bei Einzelmolekültechniken mit durch die hohen Anregungsleistungen erhöhten Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplett- und des Radikalkationzustands [66-70], kann die Verwendung von Triplett und Radikalkation löschenden Additiven zu einer Fluoreszenzsignalsteigerung führen.

Im diesem Kapitel wird der Effekt von drei verschiedenen Additiven, auf die Fluoreszenzzählrate des *Rhodamin 110* (*Rh 110*) untersucht, wobei die Additive verschiedene Dunkelzustände löschen [30, 71, 72]. Bei den Additiven handelt es sich um:

- 4-[(4-Aminophenyl)diazenyl]benzoesäure (*A-AZB-C*, Radikalkation und Triplettlöcher)
- 4-(Phenylazo)-benzoesäure (*AZB-C*)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (*Trolox*)

(die chemische Struktur der Verbindungen siehe Kapitel 5.12)

3.2.2.1 Das elektronische Zustandsmodell von *Rh 110*

Um die Wirkung der Additive auf das Fluorophor zu verstehen, muss zuerst das elektronische Zustandsmodell betrachtet werden (Abbildung 3.2-1). Die kinetischen Parameter von *Rh 110* sowie der eingesetzten Additive, die für Beschreibung des Zustandsmodells notwendig sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Auswertung der Fluoreszenzintensität und der Korrelationsterme der Fluoreszenzkorrelationsfunktion ermittelt.

Bei den im Rahmen dieses Kapitels betrachteten Experimenten wurde ausschließlich ein Argon Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Laser}} = 496.5 \text{ nm}$ als Anregungsquelle verwendet (Kapitel 3.2.3.7). Bei dieser Anregungswellenlänge und dem

Absorptionsmaxim des *Rh 110* von $\lambda_{\max Abs(Rh\ 110)} = 496\text{ nm}$ ($S_0 \rightarrow S_1$ Übergang) wird der Fluorophor zuerst in den S_1 -Zustand angeregt. Die Geschwindigkeitskonstante der Anregung in den S_1 -Zustand beträgt $k_{01} = 650\text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kapitel 3.2.3.3).

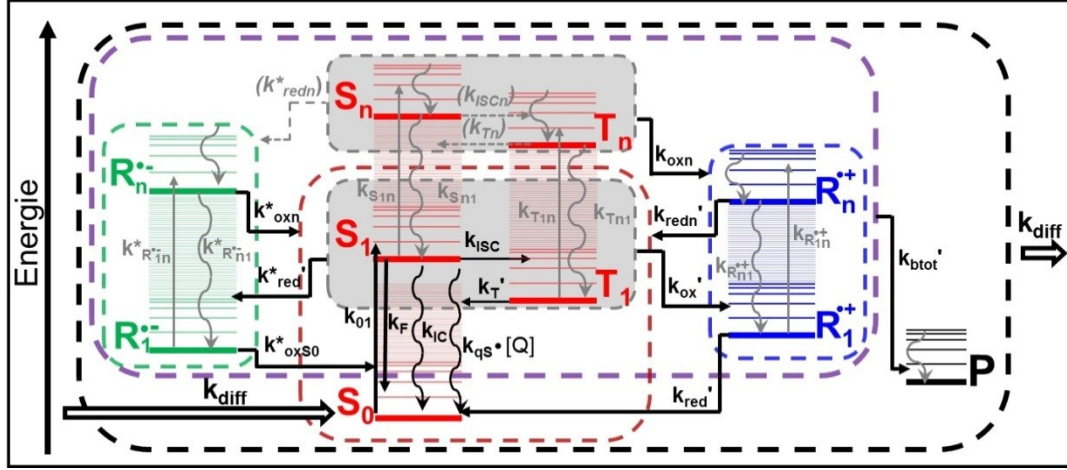


Abbildung 3.2-1 Kinetisches Modell eines Fluorophors mit Singulett- (S), Triplett- (T) Radikalanion- ($R^\bullet$), Radikalkationenzuständen ($R^{\bullet+}$) Photozerstörung (P) und der Austauschrate (k_{diff}) mit der die Farbstoffe in das Detektionsvolumen hinein bzw. heraus diffundieren [24, 63, 65]. Die schwarzen Pfeile repräsentieren Übergänge, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnten. Die grauen Pfeile repräsentieren Übergänge, die unter im Rahmen dieser Arbeit vorherrschenden experimentellen Bedingungen nicht direkt beobachtet werden konnten. Die grauen gestrichelten Pfeile repräsentierten die Übergänge, die zwar thermodynamisch erlaubt sind, können aber im Rahmen des diskutierten kinetischen Modells vernachlässigt werden. Die gewellten Pfeile stehen für strahlungslose Relaxationen (Kapitel 1.1.1). Alle Geschwindigkeitskonstanten, die in direkten Bezug zum Radikalanionenzustand stehen, sind durch ein Stern nach dem Muster k_x^* gegenzeichnet. Damit die Abbildung übersichtlich bleibt sind in einigen Fällen mehrere Prozesse durch einen gemeinsamen Pfeil dargestellt. Die entsprechenden Pfeile in der Abbildung unterscheiden sich dadurch, dass sie entweder direkt bei den betreffenden Zuständen oder bei den die Zustände zusammenfassenden Boxen beginnen bzw. enden.

Anschließend kann der Fluorophor vertikal in den in den S_0 -Zustand unter Abgabe eines Photons ($\lambda_{\max F(Rh110)} = 520\text{ nm}$) oder mittels interner Konversion sofort zurückkehren.

Bei einer Beobachteten Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_{0(Rh110\text{ in } H_2O)} = 4.0\text{ ns}$ und einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_{F(Rh110\text{ in } H_2O)} = 0.89$ (Kapitel 3.2.3.1) betragen die Geschwindigkeitskonstanten für die Fluoreszenz und die interne Konversion $k_F = 2.25 \cdot 10^8\text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{IC} = 0.25 \cdot 10^8\text{ s}^{-1}$ (Kapitel 3.2.3.2 Gleichungen 3.2-3 und 3.2-4).

Zusätzlich kann der angeregte Fluorophor aus dem S_1 -Zustand horizontal in die angeregten Schwingungszustände des energetisch darunterliegenden Triplettzustands wechseln ($k_{ISC} = 1 \cdot 10^6\text{ s}^{-1}$ [24, 63]), von wo nach der Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des T_1 -Zustands eine Relaxation über horizontale

Wechsel in einen angeregten Schwingungszustand des S_0 -Zustands ($k_T = 4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ [24, 63]) mit anschließender Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand des S_0 -Zustands erfolgen kann. Darüber hinaus kann der Fluorophor durch die Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons aus den S_1 - und T_1 -Zuständen in den energetisch darunterliegenden Radikalkationenzustand (R_1^{*+}) bzw. in den Radikalanionenzustand wechseln ($R_1^{\bullet-}$) [62, 73]. Die beiden Radikalzustände können durch die Aufnahme bzw. Abgabe eines Elektrons in den S_0 -Zustand relaxieren.

Der Radikalkationenzustand kann in luftgesättigter wässriger Lösung beobachtet werden, auch wenn keine weiteren Reaktionspartner als Oxidationsmittel anwesend sind, da molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungieren kann. Unter den im Rahmen dieser Arbeit vorherrschenden experimentellen Bedingungen für FCS- und Einzelmolekülmessungen (Rhodamin Konzentration $c < 2 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ in luftgesättigten Phosphatpuffer 25 mM bei pH 7) liegt die Relaxationsrate des R_1^{*+} -Zustands bei $k_{red} \leq 10^3 \text{ s}^{-1}$ [24, 62, 73], wobei hier vermutlich Verunreinigungen des Lösungsmittels die für die Reduktion notwendigen Elektronen bereitstellen. Die Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation der S_1 - bzw. T_1 -Zustände liegt bei $k_{oxS} \approx k_{oxT} = 2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ [63]. Im Vergleich zur Population des Radikalkationenzustands bleibt die Population des Radikalanionenzustands in einer luftgesättigten wässrigen Lösung solange vernachlässigbar bis ein Reduktionsmittel als Reaktionspartner für Rhodamin vorhanden ist. Der Grund dafür ist eine große Relaxationsrate des Radikalanionenzustands von $k_{ox0}^* = 1.8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ [63] in einer luftgesättigten wässrigen Lösung¹.

Bei höheren Photonendichten, die typisch für Einzelmolekül-Messungen sind, können höher angeregte Zustände durch die Absorption eines zweiten Photons aus einem der ersten angeregten Zustände (S_1 , T_1 , R_1^{*+} , $R_1^{\bullet-}$) erreicht werden [62, 73] (die Absorptionsquerschnitte der elektronischen Zustände sind in Kapitel 3.2.3.3 angegeben). Die Relaxation aus den höher angeregten Zuständen kann analog zu den

¹ Bei einer Lebensdauer des Radikalanionenzustands in wässriger Lösung ohne Sauerstoff im Bereich von Millisekunden ist diese schnelle Relaxation auf die Reaktion des Radikalanions mit dem gelösten Sauerstoff zurückzuführen. Bei einer Konzentration des Sauerstoffs in luftgesättigter wässriger Lösung von $[Q]_{O_2} = 286 \mu\text{M}$ (berechnet aus Henry-Konstante von $k_H = 0.0013 \text{ M} \cdot \text{bar}$ [74] und dem Partialdruck des Sauerstoffs unter Atmosphärischen Bedingungen von $p_{O_2} = 0.22 \text{ bar}$) beträgt die Sauerstoff abhängige Geschwindigkeitskonstante für Löschung des Radikalanionenzustands $k_{qoxR}^* = 6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (siehe Gleichung 3.2-1)

ersten angeregten Zuständen direkt vertikal oder über horizontalen Wechsel zwischen den verschiedenen Zuständen erfolgen. Im Vergleich zu den Zuständen S_1 und T_1 zeigen die höher angeregten Zustände S_n und T_n sehr schnelle Relaxationsrate von $k_{Tn1} \approx k_{Sn1} \approx 5 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ [65], deswegen können horizontale Übergänge zwischen den beiden Zuständen (k_{ISCn} und k_{Tn}) in dieser Arbeit vernachlässigt werden. Die Oxidation der höher angeregten Zustände (S_n , T_n , R_n^*) kann „spontan“ ohne einen Reaktionspartner (Photoionisation) erfolgen [62, 73]. Dagegen erfordert die Reduktion eines Zustands grundsätzlich einen Reaktionspartner, der die benötigten Elektronen bereitstellt.

Die FCS-Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit an einem Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7, siehe auch Kapitel 2.3) mit einer konfokalen Messanordnung durchgeführt. In diesem Zusammenhang muss bei einer kinetischen Betrachtung zusätzlich die Austauschrate (k_{diff}) mit der die Farbstoffe in das Detektionsvolumen hinein bzw. heraus diffundieren berücksichtigt werden (vergl. Kapitel 2.4.2). Im Rahmen aller in dieser Arbeit hergeleiteten Modelle (Kapitel 3.2.4.1) wird davon ausgegangen, dass die in das Detektionsvolumen hinein diffundierenden Farbstoffe sich grundsätzlich im S_0 -Zustand befinden.

Tabelle 3.2-1 Zusammenfassung aller bereits bekannten Geschwindigkeitskonstanten für die Population und Depopulation der elektronischen Zustände und optische Eigenschaften von *Rh 110*

k_F [$10^8 \cdot \text{s}^{-1}$]	$\Phi_{F(H_2O)}^a$	k_{01} [$\text{cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	k_{ISC}^b [$10^5 \cdot \text{s}^{-1}$]	k_T^b [$10^5 \cdot \text{s}^{-1}$]
2.25	0.89	650	10	4
k_{red}^b [s^{-1}]	k_{ox}^c [s^{-1}]	k_{oxn}^c [$10^8 \cdot \text{s}^{-1}$]	k_{oxS0}^{*b} [$10^5 \cdot \text{s}^{-1}$]	k_{IC}^d [$10^8 \cdot \text{s}^{-1}$]
100	2100	$5.8 \cdot 10^8$	1.8	0.25
$Abs. Max^e$ [nm]	$Em. Max^e$ [nm]	$\epsilon(496 \text{ nm})^e$ [$10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]		
496	520	6.8		

^aKapitel 3.2.3.1

^b[63]

^cdiese Konstanten Representieren aus den Geschwindigkeitskonstanten aus dem Triplett- und Singulettzuständen mit $k_{ox} = k_{oxS1} = k_{oxT1}$ bzw. $k_{oxn} = k_{oxSn} = k_{oxTn}$ [63]

^dKapitel 1.1.2 Kapitel 3.2.3.2 Gleichungen 3.2-3 und 3.2-4

^eAbsorptionsmaximum $Abs. Max$, Emissionssmaximum $Em. Max$ und Absorptionskoeffizient ϵ sind für das Lösungsmittel Wasser angegeben.

Bei den für FCS-Messungen typischen hohen Leistungen kann zusätzlich die Photozerstörung des Fluorophors auftreten. Die Photozerstörung kann aus jedem der

angeregten Zustände erfolgen und zu verschiedenen irreversiblen photochemischen Produkten führen. Alle irreversiblen Produkte der Photozerstörung sind in der Abbildung 3.2-1 als der elektronische Zustand P zusammengefasst. Die Geschwindigkeit der Photozerstörung der Rhodamine aus den ersten angeregten Zuständen verläuft mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_b \approx 10^2 \text{ s}^{-1}$ [24, 65]¹.

3.2.2.2 Der Einfluss der Additive auf die elektronischen Zustände des Rh 110

Alle Relaxationsprozesse der angeregten elektronischen Zustände können mittels eines geeigneten Additivs durch einen Energie- bzw. einen Elektronentransfer beeinflusst werden. Bei Relaxationsraten der höher angeregten S_n - und T_n - Zustände von $k_{Tn1} \approx k_{Sn1} \approx 5 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ können additivabhängige Relaxationsprozesse aus diesen beiden Zuständen vernachlässigt werden, weil bei einer Stoßrate zwischen einem Farbstoffmolekül und einem potentiellen Reaktionspartner von $k_{qdiff} \leq 7 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (Kapitel 5.9) und in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration der Additive von $[Q] < 10^{-3} \text{ M}$, die Geschwindigkeiten der Reaktion aus diesen Zuständen zu klein sind.

Die Relaxationsraten der angeregten Radikalzustände sind nicht bekannt. Daher könnten eventuelle additivabhängige Prozesse aus diesen Zuständen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Geschwindigkeitskonstanten (k_x), bei denen im Rahmen dieser Arbeit eine Abhängigkeit von der Konzentration eines Additivs beobachtet wurde, sind in der Abbildung 3.2-1 mit einem Strich gegenzeichnet (k_x'). Diese Geschwindigkeitskonstanten setzen sich aus einer fluorophorspezifischen und einer additivspezifischen Komponente nach Gleichung 3.2-1 zusammen.

$$k_x' = k_x + k_{qx} \cdot [Q] \quad 3.2-1$$

k_x = Farbstoffspezifische additivunabhängige Geschwindigkeitskonstante

k_{qx} = Additivspezifische Geschwindigkeitskonstante

$[Q]$ = Additivkonzentration

¹ Zusätzlich wurde bereits mittels *FCS*-Messungen die Photozerstörung von Rhodaminen aus den höher angeregten Zuständen mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_{bn} \approx 0.003 \text{ s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ beobachtet, wobei bei diesen *FCS*-Messungen die Besetzung des Radikalkationzustands nicht berücksichtigt wurde, so dass angenommen werden kann, dass die als Photozerstörung interpretierte Beobachtung auf die Oxidation zum Radikalkation zurückzuführen ist.

Im Zusammenhang mit der Optimierung des Fluoreszenzsignals von *Rh 123* durch die Löschung seiner Dunkelzustände, wurde bereits früher eine Strategie zur Auswahl von Dunkelzustände löschenden Additiven vorgeschlagen [64].

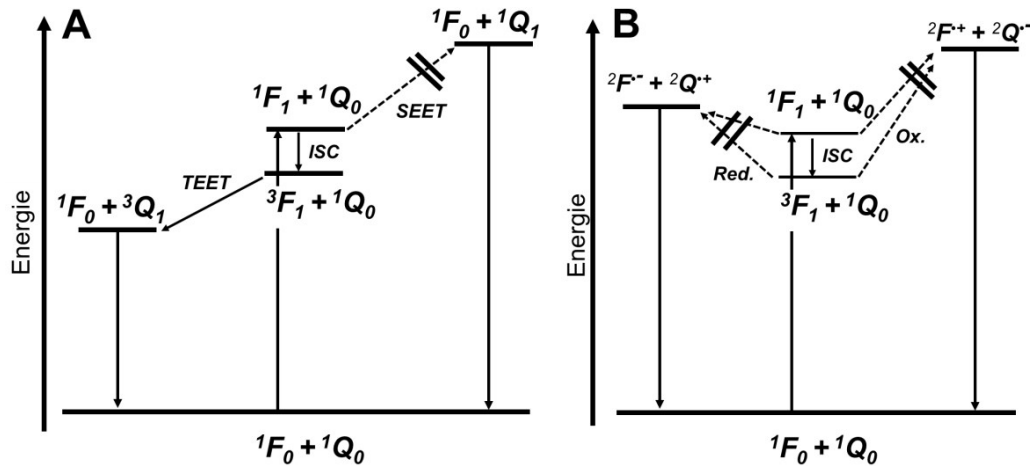


Abbildung 3.2-2 Überblick über Energien der Zustände von an Löschprozessen beteiligtem Additiv Q bzw. Fluorophor F , wie sie in der Referenz [64] vorgeschlagen wurden. Die gestrichelten Pfeile repräsentieren thermodynamisch verbotene Übergänge.

A: Für Triplettlöschung optimale Verteilung der Energien der beteiligten Zustände von F und Q . Die Energien der Zustände sind so verteilt, dass der Triplett-Triplett-Energietransfer (TEET) von Fluorophor auf das Additiv möglich ist, während Singulett-Singulett-Energietransfer (SEET) thermodynamisch verboten ist.

B: Die Energien der Zustände bei der Oxidation bzw. Reduktion des Fluorophors mittels Additiv sind so verteilt, dass die Oxidation bzw. Reduktion der Triplett- oder Singulettzustände thermodynamisch verboten ist. Damit können die Additive keine weiteren dunklen Zustände des *Rh 110* induzieren.

Die Umsetzung der Strategie bestand darin die Additive so auszuwählen, dass ausschließlich die Löschung des Triplettzustands des Fluorophors mittels eines Triplett-Triplett-Energietransfers durch die Additive thermodynamisch erlaubt ist. Die Löschung des S_1 -Zustands durch die Additive und alle Elektronentransferreaktionen zwischen den Additiven und dem Fluorophor sollten thermodynamisch verboten sein. Die notwendigen thermodynamischen Voraussetzungen für die Realisierung einer solchen Strategie sind in Abbildung 3.2-2 visualisiert.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Azobenzole sind in der Lage die Triplettenergie eines Rhodamins aufzunehmen, da deren Triplettenergie ($E_T = 1.5 \text{ eV}$ [75]) deutlich unterhalb der Triplettenergie des *Rh 110* ($E_T = 1.9 \text{ eV}$ Kapitel 3.2.3.5) liegt¹. Gleichzeitig ist die Energie der S_1 -Zustände bei allen drei Additiven deutlich größer

¹. Der Triplett-Energietransfer beim *Rh 110* erfolgt über einen Elektronenaustausch nach dem Dexter Mechanismus (vergleiche Kapitel 1.1.3) [24]

im Vergleich zur Energie des S_1 -Zustands von *Rh 110* (Tabelle 3.2-5). Dies führt dazu, dass kein Singulett-Singulett-Energietransfer von *Rh 110* auf die Additive stattfinden kann. Damit erfüllen die Additive *AZB-C* und *A-AZB-C* die thermodynamischen Voraussetzungen, die in Abbildung 3.2-2 A dargestellt sind für Löschung des Triplettzustands des *Rh 110* ohne Singulett-Singulett-Energietransfer. Die thermodynamischen Voraussetzungen für Elektronentransferreaktionen zwischen den Additiven und dem Fluorophor (Abbildung 3.2-2 B) werden von keinem der eingesetzten Additive erfüllt. Das Additiv *A-AZB-C* ist in der Lage die ersten angeregten Singulett-, Triplett- und Radikalkation-Zustände zu reduzieren. Das Additiv *A-AZB* kann den ersten angeregten Singulettzustand oxidieren. Das Additiv *Trolox* kann wie das Additiv *A-AZB-C* Singulett-, Triplett- und Radikalkationzustände reduzieren und zusätzlich den Singulettzustand oxidieren [76]. Alle Additive sind thermodynamisch in der Lage alle höher angeregten Zustände sowohl zu oxidieren als auch zu reduzieren (Kapitel 3.2.3.5).

3.2.2.3 Übersicht der verwendeten Grundmodelle

Bei der Auswertung der Fluoreszenzmessungen des *Rh 110* müssen je nach Additiv bzw. je nach eingesetzten Leistungsdichtebereich nur bestimmte Reaktionspfade des in der Abbildung 3.2-1 dargestellten Zustandsdiagramms bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. Aus diesem Grund kommen im Rahmen dieser Arbeit verschiedene kinetische Grundmodelle zum Einsatz (die Übersicht der berücksichtigten elektronischen Zustände bei den verwendeten Grundmodellen ist in Tabelle 3.2-2 zu finden):

- *Modell 1a*: Modell bei dem angenommen wird, dass die Population des Radikalanions vernachlässigbar ist. Dieses Modell beinhaltet Singulett-, Triplett- und Radikalkationzustände. Zusätzlich werden bei dem Modell die Photozerstörung (Zustand *P*) und die Austauschrate k_{diff} , mit der die Farbstoffe in das Detektionsvolumen hinein bzw. heraus diffundieren, berücksichtigt. (Kapitel 3.2.4.1 S 82).
- *Modell 1b*: Modell das *Modell 1a* entspricht, wobei eine sehr langsame Kinetik des Radikalkationzustands im Vergleich zu der Kinetik der Singulett-

und Triplettzustände angenommen wird ($(k_{ox} + k_{red}) \ll (k_{ISC} + k_T)$ bzw. $(k_{ox} + k_{red}) \ll (k_{0I} + k_0)$). Diese Annahme erlaubt die formale Zusammenfassung der Singulett und Triplettzustände zu einem einzigen Zustand (ST) Kapitel 3.2.4.1 S 87.

- *Modell 2*: Modell mit nur drei elektronischen Zuständen bestehend aus S_0 -, S_1 -, T_1 -Zuständen (Kapitel 3.2.4.1 S 85).
- *Modell 3a*: Modell bei dem angenommen wird, dass die Photozerstörung zu langsam ist um die Besetzungswahrscheinlichkeiten aller anderen Zustände bemerkbar zu beeinflussen. Das Modell enthält Singulett-, Triplett-, Radikalkation- und Radikalkationzustände. Zusätzlich wird hier die Austauschrate k_{diff} berücksichtigt (Kapitel 3.2.6.1).
- *Modell 3b*: Entspricht *Modell 3a*, wobei bei diesem Modell, vergleichbar mit *Modell 1b*, die Singulett-, Triplett- und Radikalanionzustände zu einem einzigen Zustand ($STR^{\bullet}$) zusammengefasst werden (Kapitel 3.2.6.3).
- *Modell 4*: Modell für die Photozerstörung bei niedrigen Leistungsdichten. Bei diesem Modell werden nur die Zustände S_0 , S_1 , T_1 , $R_1^{\bullet+}$ und P berücksichtigt (Kapitel 3.2.9.1).

Bei der Berücksichtigung der höherangeregten Zustände (S_n , T_n , $R_n^{\bullet+}$, $R_n^{\bullet-}$) wird grundsätzlich davon ausgegangen, dass Relaxation dieser Zustände deutlich schneller im Vergleich zu deren Anregung verläuft. Dies hat zur Folge, dass in erster Näherung die höher angeregten Zustände keinen bemerkbaren Einfluss auf die Besetzungswahrscheinlichkeit der direkt darunterliegenden Zustände haben. Aus diesem Grund werden die höher angeregten Zustände bei den Modellen 1a, 1b, 3a, und 3b, formal mit den direkt darunter liegende Zuständen zu einem Zustand (S , T , $R^{\bullet+}$ und $R^{\bullet-}$) zusammengefasst.

Tabelle 3.2-2 Übersicht der berücksichtigten elektronischen Zustände bei den verwendeten Grundmodellen.

„X“ und „----“ stehen für die berücksichtigte bzw. nicht berücksichtigte Zustände. In klammern stehen die für die zusammengefassten Zustände verwendeten Namen

Modell	S_0	S_l	S_n	T_l	T_n	$R_1^{\bullet-}$	$R_n^{\bullet-}$	$R_1^{\bullet+}$	$R_n^{\bullet+}$	P
1a	X	X (S)		X (T)		X		X ($R^{\bullet+}$)		X
1b	X (ST)					----	----	X ($R^{\bullet+}$)		X
2	X	X	---	X	----	----	----	----	----	----
3a	X	X (S)		X (T)		X ($R^{\bullet-}$)		X ($R^{\bullet+}$)		----
3a	X (STR $^{\bullet-}$)							X ($R^{\bullet+}$)		----
4	X	X		X	----	----	----	X	----	----

3.2.3 Materialien und Methoden

3.2.3.1 Fluoreszenzquantenausbeute von Rh 110

Die Fluoreszenzquantenausbeute von *Rh 110* in wässriger Lösung kann mit Hilfe der in der Literatur zu findenden Fluoreszenzquantenausbeute von *Rh 110* in Ethanol ($\Phi_{F(Rh110, EtOH)} = 0.92$ [77]) nach Gleichung 3.2-2 berechnet werden.

$$\Phi_{F(H_2O)} = \Phi_{F(EtOH)} \cdot \frac{n_{(H_2O)}^2}{n_{(EtOH)}^2} \quad 3.2-2$$

$$\Phi_{F(H_2O)} = \Phi_{F(EtOH)} \cdot \frac{1.34^2}{1.36^2} = 0.92 \cdot 0.97 = 0.89$$

(bei $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $\lambda \approx 500\text{ nm}$)

3.2.3.2 Bestimmung von k_F und k_{IC} des Rh 110

Wird berücksichtigt, dass bei im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten *Rh 110* die Multiplizitätsänderung mehrere Größenordnungen langsamer als die Fluoreszenz bzw. interne Konversion abläuft ($k_{ISC} \ll k_F$ bzw. k_{IC}), so können Gleichung 1.1-7 und Gleichung 1.1-8 zu 3.2-3 bzw. Gleichung 3.2-4 vereinfacht werden.

$$\tau_0 \approx \frac{1}{k_F + k_{IC}} \quad 3.2-3$$

$$\Phi_F \approx \frac{k_F}{k_F + k_{IC}} \quad 3.2-4$$

Damit können die Geschwindigkeitskonstanten k_F und k_{IC} direkt aus der bekannten Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_0 = 4\text{ ns}$ und der Fluoreszenzquantenausbeute (siehe Kapitel 3.2.3.1) zu $k_F = 2.25 \cdot 10^8\text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{IC} = 0.25 \cdot 10^8\text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.

3.2.3.3 Anregungsraten und Absorptionsquerschnitte elektronischer Übergänge von Rh 123 (und Rh 110)

Bei bekannten Extinktionskoeffizienten lassen sich die molekularen Absorptionsquerschnitte $\sigma(\lambda)$ (Gleichung 1.1-2) und Anregungsraten k_{an} (Gleichung 1.1-3) für einen elektronischen Übergang berechnen. In Tabelle 3.2-3

sind Daten für verschiedene Übergänge von *Rh 123* zusammen getragen, wobei aufgrund der Ähnlichkeit von *Rh 123* und *Rh 110* angenommen wird, dass diese Daten auch für *Rh 110* verwendet werden können.

Tabelle 3.2-3 Extinktionkoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$, Absorptionsquerschnitte $\sigma(\lambda)$ und Anregungsraten k_{an} für zwei Photonen Prozesse (bei $\lambda = 496.5 \text{ nm} \rightarrow \gamma = 2.5 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ W}^{-1}$) von *Rh 123* abgeschätzt aus den transienten Absorption-Spektren [62, 73]

	$S_0 \rightarrow S_1$ (ein Photon Anregung)	$T_1 \rightarrow T_n$	$R_1^{\bullet+} \rightarrow R_n^{\bullet+}$	$R_1^{\bullet-} \rightarrow R_n^{\bullet-}$
$\sigma(\lambda)$ [cm^{-2}]	$2.6 \cdot 10^{-16}$	$< 3.8 \cdot 10^{-18}$	$3 \cdot 10^{-16}$	$3.8 \cdot 10^{-18}$ - $1.9 \cdot 10^{-17}$
$k_{an} = \sigma(\lambda) \cdot \gamma(\lambda)$ [$\text{s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1}$]	650	< 10	760	10-50
$\varepsilon(\lambda)$ [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]	$6.8 \cdot 10^4$	$< 10^3$	$8 \cdot 10^4$	$10^3 - 5 \cdot 10^3$
Die angegebenen Extinktionkoeffizienten bei den Absorptionsmaxima der angeregten Zustände des <i>Rh 123</i> [73]				
$\varepsilon(\lambda_{\max})$ [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]		$1.1 \cdot 10^4$ (390nm)	$8 \cdot 10^4$ (500nm)	$2.8 \cdot 10^4$ (385nm)

3.2.3.4 Untergrundzählrate der verwendeten Additive

Die Untergrundzählrate (U) des eingesetzten Phosphatpuffers mit und ohne Additive stieg linear mit der Leistungsdichte (Abbildung 3.2-3), deswegen erfolgte die Bestimmung der Untergrundzählrate in dem die Untergrundzählrate für jede der eingesetzten Additivkonzentrationen bei 3 verschiedenen¹ Leistungsdichten gemessen, und anschließend für alle restlichen eingesetzten Leistungsdichten linear extrapoliert wurde. Die Zugabe von bis zu 1 mM des Additivs *Trolox* führte zu keiner Erhöhung der Untergrundzählrate des Puffers. Im Gegensatz dazu wurde eine deutliche Erhöhung der Untergrundzählrate beobachtet, wenn die Additive *AZB-C* oder *A-AZB-C* zugegeben wurden (Abbildung 3.2-3). Der Grund hierfür ist die Fluoreszenz der beiden Additive.

Die Absorptionsbanden der beiden Additive liegen im Bereich der verwendeten Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{Laser}} = 496.5 \text{ nm}$) (Abbildung 3.2-4, Tabelle 3.2-4).

¹ Zusätzlich wurde eine Messung bei ausgeschaltetem Laser durchgeführt um die Dunkelzählrate der Detektoren zu bestimmen. Die Dunkelzählrate der Detektoren betrug durchgehend $U_{\text{Dunkel}} = 0.2 \text{ kHz}$

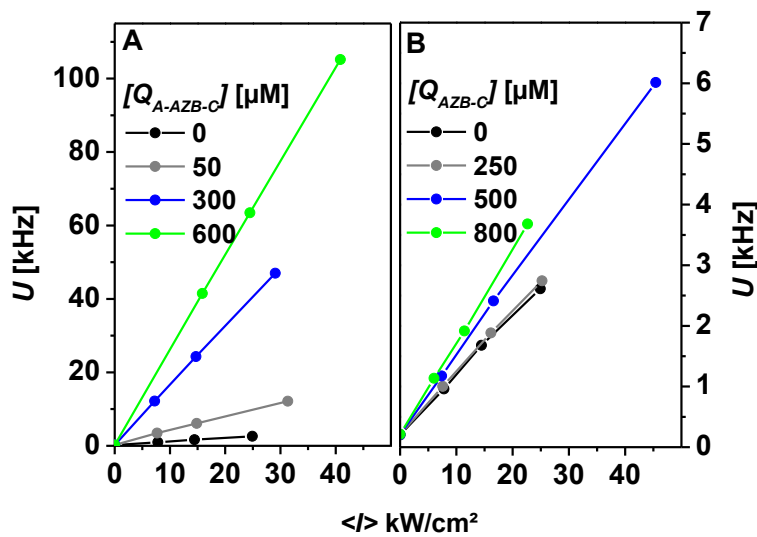


Abbildung 3.2-3 Untergrundzählrate U der Additive $A-AZB-C$ (A) und $AZB-Z$ (B) im Phosphatpuffer (25 mM pH 7), gemessen am im Kapitel 3.2.3.7 beschriebenen Fluoreszenzaufbau

Speziell bei dem Additiv $A-AZB-C$ wird eine starke Absorption im Bereich der Wellenlänge des Laser beobachtet (Abbildung 3.2-4). Die entsprechende Fluoreszenzbande dieses Additivs ist bereits so stark, dass sie mit einem Fluoreszenzspektrometer (Kapitel 2.2) gemessen werden kann (Abbildung 3.2-5). Die Fluoreszenzbande des $A-AZB-C$ liegt direkt im Detektionsfenster des Fluoreszenzaufbaus, was die besonders hohe Untergrundzählrate in Gegenwart des $A-AZB-C$ erklärt.

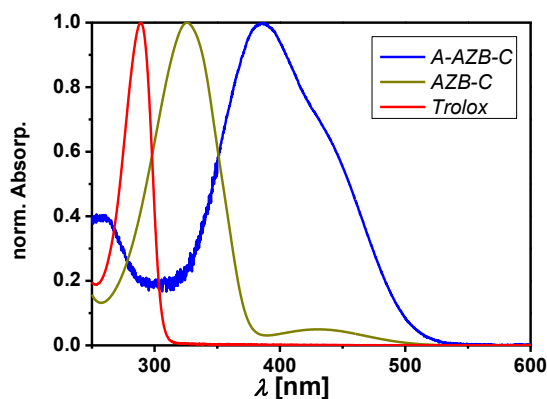


Abbildung 3.2-4 Absorptionsbanden der Additive $A-AZB-C$, $AZB-Z$, und $Trolox$ im Phosphatpuffer (25 mM pH 7).

Tabelle 3.2-4 Extinktionkoeffizienten ($\epsilon_{(max)}$) der Additive bei dem jeweiligen Absorptionsmaximum ($\epsilon_{(max)}$) und bei der verwendeten Anregungswellenlänge von $\lambda = 496.5 \text{ nm}$

Additiv	<i>A-AZB-C</i>	<i>AZB-Z</i>	<i>Trolox</i>
$\epsilon_{(max)} [cm^{-1} \cdot M^{-1}]$	16700 (385 nm)	19100 (325 nm)	2500 (290 nm)
$\epsilon_{(\lambda = 496.5 \text{ nm})} [cm^{-1} \cdot M^{-1}]$	1700	250	≈ 0

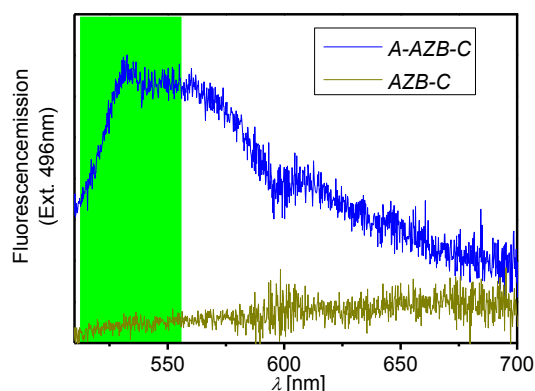


Abbildung 3.2-5 Fluoreszenzbanden der Additive *A-AZB-C* und *AZB-C* im Phosphatpuffer (25 mM pH 7). Aufgrund von sehr schwacher Fluoreszenzzählrate konnte keine Fluoreszenzbande des Additivs *AZB-C* mittels eines Fluoreszenzspektrometers gemessen werden. Das grüne Rechteck markiert das durch den Bandpass-Filter (AHF, (HQ 533/46)) definierte Fluoreszenzdetektionsfenster des Fluoreszenzaufbaus (Kapitel 3.2.3.7).

Die Lebensdauer der Fluoreszenz des *A-AZB-C* war kürzer als 200 ps, was kürzer ist als die Geräteantwortfunktion des verwendeten Fluoreszenzspektrometers (Kapitel 2.2), und könnte deswegen nicht quantitativ bestimmt werden.

3.2.3.5 Thermodynamisch erlaubte Redoxreaktionen zwischen *Rh 110* und den Additiven

Die Standardreaktionsenthalpien (ΔG_{ET}) für Elektronentransferreaktionen zwischen den Additiven und *Rh 110* sind in Tabelle 3.2-5 zusammengetragen. Die für die Bestimmung von ΔG_{ET} notwendigen Energien der S_1 - und T_1 -Zustände wurden aus den Energien der gleichen Zustände von *Rh 123* [24] abgeschätzt ($E_{XRh\ 110} \approx E_{XRh\ 123} + 0.02 \text{ eV}$). Die Energien der höher angeregten Zustände X_n wurden mit Hilfe der Summe der Energie der Photonen des verwendeten Lasers ($\lambda_{Laser} = 496.5 \text{ nm} = 2.5 \text{ eV}$) und der Energie des entsprechenden ersten angeregten Zustands berechnet.

Tabelle 3.2-5 Elektrochemische Potenziale und Energien der Übergänge von *Rh 110* bzw. der verwendeten Additive gemessen in Acetonitril bzw. DMF [24] und mit Hilfe der Rehm-Weller-

Gleichung (Gleichung 1.1-13¹) berechnete freie Enthalpie ΔG_{ET} für eine Elektronentransferreaktion zwischen einem Additiv und einem angeregten Zustand von Rh 110. Die negativen Werte von ΔG_{ET} zeigen die thermodynamisch erlaubten Elektronentransferreaktionen an.

	<i>Rh 110</i>	<i>AZB-C</i>	<i>A-AZB-C</i>	<i>Trolox</i>		
<i>E_{ox} [V vs. NHE.]</i>	<i>1.29</i>	<i>2.06</i>	<i>1.12</i>	<i>0.40</i>		
<i>E_{red} [V vs. NHE.]</i>	<i>-0.61</i>	<i>-0.81</i>	<i>-1.55</i>	<i>-0.82</i>		
<i>Energie der S₀→S₁ Übergänge (E_{S0→S1}) der Additive (vergl. Kapitel 3.2.3.3)</i>						
		<i>AZB-C</i>	<i>A-AZB-C</i>	<i>Trolox</i>		
<i>E_{S0→S1} [eV](nm)</i>		<i>3.8 (325)</i>	<i>3.2 (385)</i>	<i>4.2 (290)</i>		
<i>E [eV] Energie der Übergänge² von Zustand X in den S₀-Zustand des Rh 110</i>						
<i>S_I</i>	<i>T_I</i>	<i>S_n</i>	<i>T_n</i>			
<i>2.45</i>	<i>1.94</i>	<i>4.95</i>	<i>4.44</i>			
<i>E [eV](nm) Energie der S₀→S₁ Übergänge der Additiven (vergl. Kapitel Kapitel 3.2.3.3)</i>						
<i>ΔG_{ET,ox} [eV] (für die Oxidation eines Zustands von Rh 110)</i>						
	<i>S_I</i>	<i>T_I</i>	<i>R_I⁻</i>	<i>S_n</i>	<i>T_n</i>	<i>R_n⁻</i>
<i>AZB-C</i>	-0.35	<i>0.16</i>	<i>0.20</i>	-2.85	-2.34	-2.3
<i>A-AZB-C</i>	<i>0.39</i>	<i>0.90</i>	<i>0.94</i>	-2.11	-1.6	-1.56
<i>Trolox</i>	-0.34	<i>0.17</i>	<i>0.21</i>	-2.84	-2.33	-2.29
<i>ΔG_{ET,red} [eV] (für die Reduktion eines Zustands von Rh 110)</i>						
	<i>S_I</i>	<i>T_I</i>	<i>R_I⁺</i>	<i>S_n</i>	<i>T_n</i>	<i>R_n⁺</i>
<i>AZB-C</i>	<i>0.22</i>	<i>0.73</i>	<i>0.77</i>	-2.28	-1.77	-1.73
<i>A-AZB-C</i>	-0.72	-0.21	-0.17	-3.22	-2.71	-2.67
<i>Trolox</i>	-1.44	-0.93	-0.89	-3.94	-3.43	-3.39

¹ Der Term ($\Delta G(\epsilon)$), der die Coulomb-Wechselwirkung und die Solvatisierung durch Lösungsmittelmoleküle beschreibt, wird hier vernachlässigt. Zusätzlich werden hier mögliche Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktionen bei der Betrachtung der Energien der Radikalzustände außeracht gelassen, da solche Reaktionen keinen Einfluss auf die in diese Arbeit diskutierten Prozesse haben.

² Zu beachten ist, dass bei den ersten angeregten Zuständen die Energie zwischen dem niedrigsten Schwingungszustand des ersten angeregten Zustands und dem niedrigsten Schwingungszustand des S_0 -Zustands verwendet werden muss.

3.2.3.6 Singulettlöschung durch die verwendeten Additive

Die Messungen der Fluoreszenzlebensdauer des *Rh 123* in Gegenwart der verwendeten Additive zeigen, dass alle Additive praktisch mit einer diffusionskontrollierten Geschwindigkeit den Singulettzustand des Rhodamins löschen können (Abbildung 3.2-6). Beim Additiv *A-AZB-C* scheint die Geschwindigkeitskonstante der Löschung des Singulettzustands mit $k_{qS(A-AZB-C)} = 2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ über der maximal möglichen diffusionskontrollierten Stoßrate zu liegen. Dies ist vermutlich auf die Bildung von langlebigen fluoreszierenden Grundzustandskomplexen zwischen Rhodamin und *A-AZB-C* zurückzuführen.

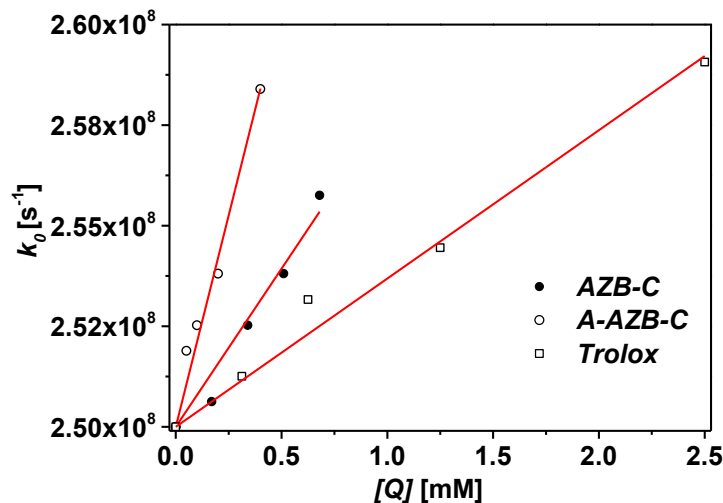


Abbildung 3.2-6 Aus Fluoreszenzlebensdauermessungen (siehe Kapitel 2.2) berechnete Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz $k_0 = 1/\tau_0$ von *Rh 123* in luftgesättigtem Phosphatpuffer mit den Additiven *AZB-C*, *A-AZB-C* und *Trolox*. Die Steigung der linearen Anpassung (rote Linien) entspricht der additivkonzentrationsabhängigen Konstante für die Depopulation des Singulett-Zustands k_{qS} . Für das jeweiligen Additiv ergeben sich: $k_{qS(AZB-C)} = 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{qS(A-AZB-C)} = 2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{qS(Trolox)} = 3.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und

3.2.3.7 FCS-Fluoreszenzaufbau für Fluoreszenzmessungen mit Triplett- und Radikal-Löcher (FCS-Fluoreszenzaufbau 1)

Die *FCS*- und Fluoreszenzintensität-Messungen wurden an einer modifizierten Version des Fluoreszenzaufbaus (Abbildung 2.3-1) durchgeführt.

Als Anregungsquelle wurde ein Argon-Ionen-Laser (*Melles-Griot 35LAP431-230*) verwendet. Das Anregungslicht wurde über einen Strahlteiler (*AHF, 498 DCLP*) in ein Wasserimmersions-Objektiv (*Olympus, UPLAPO 60 NA = 1.2*) eingekoppelt. Der Fluoreszenzstrahl wurde mit einem 50/50 Strahlteiler auf zwei Perkin-Elmer

Einzelphotonendetektoren (*APD*, *SPCM-AQR-14* mit einem zusätzlichen Bandpass-Filter von *AHF*, (*HQ 533/46*) aufgeteilt. Die Signale der Detektoren wurden von einem Hardware-Korrelator (*ALV-5000*, *ALV-Laser*) verarbeitet [78].

Zusätzlich zum Bandpass-Filter (*AHF*, *HQ 533/46*) wurde in Fällen, wenn das Gesamtsignal 500 kHz überstieg, ein OD-Filter von Thorlabs, (*NE10B* oder *NE03B*) verwendet.

3.2.3.8 Probenkammern für FCS-Messungen¹

Bei allen F_{cpm} -Messungen wurde die Konzentration der Fluorophore so gewählt ($c \approx 1$ nM), dass die mittlere Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen im Bereich von $N = 1$ -5 lagen.

Die FCS-Messungen wurden in einem Lösungsmitteltropfen (Phosphatpuffer (25 mM pH 7), Wasser) auf einem Deckgläschen (*Menzel*, 1.5) durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug $V = 10 \mu\text{L}$. Um das Austrocknen der Probe zu verhindern, wurde die Probe mit einem weiteren Deckgläschen abgedeckt, dabei wurde doppelseitiges Klebeband (*Tesa*) als Abstandshalter zwischen den Deckgläschen verwendet. Der Abstand zwischen den Deckgläschen betrug $d = 100 \pm 10 \mu\text{m}$ (gemessen mittels Mikrometerschraube unter Verwendung von Reflektionen des Laserstrahls von den Wasser/Glas-Grenzflächen).

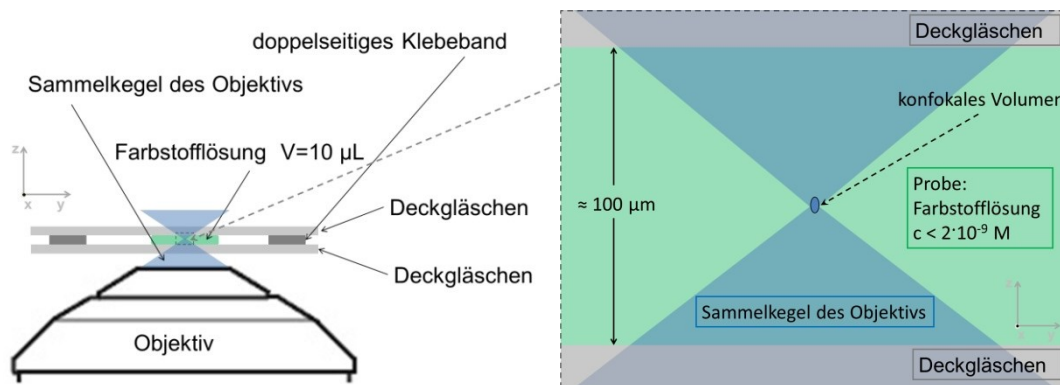


Abbildung 3.2-7 Schematische Darstellung einer FCS- oder Einzelmolekülmessanordnung

¹ Zusätzlich zur in diesem Kapitel beschriebenen Probenkammer wurde eine kommerziell erwerbbare Probenkammer (*Thermo Scientific*, *Nunc Lab-Tek II*, 155360) für die Messung des Fluoreszenzsignals verwendet (Kapitel 3.2.3.12 und 3.2.5.2).

3.2.3.9 Aufnahme der FCS-Daten

Die Messdauer bei den *FCS*-Messungen betrug je nach Gesamtsignal zwischen 60-180 Sekunden. Danach wurden die *FCS*-Kurven als eine ASCII-Datei gespeichert und anschließend mittels der in der Arbeitsgruppe geschriebenen Software „Kristine“ analysiert. Vor jeder Messung wurde die Laserleistung zuerst mittels eines Leistungs-Messgeräts (*Coherent, LabMax-Top*) im Strahlengang bestimmt. Zusätzlich wurde einmal die Leistung direkt am Objektiv gemessen. Aus dem Verhältnis zwischen der Leistung im Strahlengang und Leistung am Objektiv wurde die Transmission des Objektivs bestimmt ($T_{\text{Objektiv}} = 90 \%$). Nachfolgend wurden alle Messwerte der Leistung im Strahlengang mit der Transmission des Objektivs korrigiert um die tatsächliche Leistung an der Probe zu bestimmen. Die Bestimmung der Leistungsdichte aus der gemessenen Leistung ist in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Bei Leistungsdichtemessreihen wurden die Messungen bei den jeweiligen Leistungsdichten hintereinander durchgeführt, wobei eine Messreihe immer mit der kleinsten Leistung begonnen wurde¹. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Messungen einer Messreihe betrug 2-5 Minuten (die Zeit, die benötigt wurde für die Umstellung und die Bestimmung der Laserleistung).

3.2.3.10 Korrektur der $F_{\text{cpm}}(\text{FCS})$ bei *FCS*-Messungen mit hoher Untergrundzählrate

Bei den *FCS*-Messungen wird die Diffusionsamplitude unter anderem durch die Untergrundzählrate beeinflusst. Deswegen wurden alle mit Hilfe der Diffusionsamplitude berechneten Fluoreszenzzählraten pro Molekül $F_{\text{cpm}}(\text{FCS})$ (siehe dazu Kapitel 3.2.5.3) unter Berücksichtigung des Untergrundsignals nach der Gleichung 3.2-5 korrigiert [79].

¹ Im Laufe der Auswertung der Daten stellte sich heraus, dass die verwendete Reihenfolge bei Messungen von Leistungsdichte-Messreihen nicht optimal gewesen ist. Es ist empfehlenswert eine Messreihe mit höchster Leistung zu beginnen, weil bei höheren Leistungsdichten solche Effekte wie der Abstand des Detektionsvolumens von der Oberfläche der Deckgläschen und eine leichte Dejustierung der Position der Lochblende einen deutlich größeren Effekt haben und auf der Zeitskala einer Messreihe (Stunden) eine leichte Drift der Position der einzelnen optischen Komponente des Fluoreszenzaufbaus nicht zu vermeiden ist. Eine solche Drift der optischen Komponenten äußert sich in einer systematischen Verschiebung der Fluoreszenzintensität (siehe leichte Wellen ab einer mittleren Leistungsdichte von $\langle I \rangle = 200 \text{ kW/cm}^2$ beim Fluoreszenzsignal Abbildung 3.2-25).

$$F_{cpm}(FCS) = F_{cpm}(FCS, unkor) \cdot f \quad 3.2-5$$

$$f = \left(\frac{U}{F} + 1 \right)^2$$

$F_{cpm}(FCS)$ = Fluoreszenzzählrate pro Molekül

U = Untergrundsignal

F = Fluoreszenzsignal

3.2.3.11 Bestimmung der Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienz kann bestimmt werden, indem die nach Gleichung 3.2-51 berechnete F_{cpm} bei niedrigen Leistungsdichten mit der Gleichung 3.2-44 angepasst wird, wobei für die Besetzungswahrscheinlichkeit S_{leq} Gleichung 3.2-17 eingesetzt wird. Bei niedrigen Leistungsdichten aufgrund von kleiner Wahrscheinlichkeit für die Besetzung des Radikalkationzustands haben die Geschwindigkeitskonstanten für die Population und Depopulation des Radikalkationzustands einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Besetzungswahrscheinlichkeit S_{leq} . Deswegen können diese Konstanten entweder auf die bereits ermittelten Werte (Kapitel 3.2.4.3) fixiert oder global angepasst werden. Die Anpassung in beiden Fällen ergab für den FCS-Fluoreszenzaufbau bei niedrigen Leistungsdichten ($\langle I \rangle < 20 \text{ kW/cm}^2$) einen Wert von der Detektionseffizienz $G_{detect} = 0.022$ (Abbildung 3.2-8).

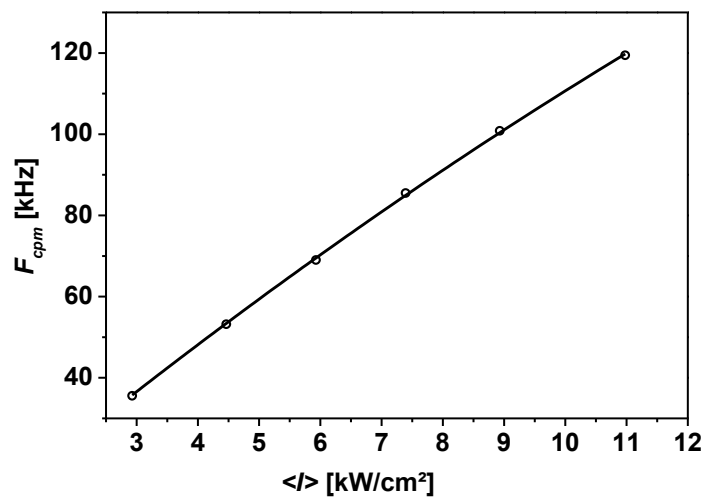


Abbildung 3.2-8 $F_{cpm}(FCS, corr)$ bei niedrigen Leistungsdichten. Die durchgezogene Linie repräsentiert eine Anpassung der Daten mit der Gleichung 3.2-44 (nähere Erklärungen siehe Text). Die Anpassung ergab für die Detektionseffizienz des FCS-Fluoreszenzaufbaus $G_{detect} = 0.022$.

Alle Geschwindigkeitskonstanten für die Population und die Depopulation des Triplettzustands und des Singulettzustands wurden bei der Anpassung auf die bereits ermittelten Werte fixiert (eine Übersicht der Konstanten ist in *Tabelle 3.2-14* (Seite 136) zu finden).

3.2.3.12 Aufnahme des Fluoreszenzsignals

Die Aufnahme des Fluoreszenzsignals erfolgte nach dem gleichen Muster wie die Aufnahme der FCS-Daten (Kapitel 3.2.3.9). Beim Fluoreszenzsignal muss jedoch beachtet, dass dieses von der Konzentration der Fluorophore in der Messzelle abhängt, deswegen wurde für die Messungen des Fluoreszenzsignals eine kommerziell erwerbbare Probenkammer (*Thermo Scientific, Nunc Lab-Tek II, 155360*) mit großen Gesamtvolumen verwendet. Das Gesamtvolumen der Probe bei Messungen betrug $V = 5$ mL. Zusätzlich wurde die Probe bei Messreihen zwischen den einzelnen Messungen umgerührt. Das Fluoreszenzsignal wurde grundsätzlich nach dem Erreichen des Fließgleichgewichtes zwischen der Photozerstörung und der Diffusion der Moleküle aus dem Bereich außerhalb des Laserstrahls aufgezeichnet ($60-180$ s¹ nach dem Start der Bestrahlung der Probe). Mehr dazu siehe Kapitel 3.2.5.2.

3.2.3.13 Bestimmung des Fluoreszenzsignals eines Fluorophors aus FCS-Messungen

Bei den F_{cpm} -Messungen wird die Konzentration der Fluorophore der Probe so gewählt ($c \approx 1$ nM), dass die mittlere Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen im Bereich von $N = 1-5$ liegt.

¹ Dieser Wert ist leistungsdichteabhängig.

Das Fluoreszenzsignal eines einzelnen Fluorophors¹ $F_{cpm}(FCS)$ kann direkt aus FCS -Messungen bestimmt werden. Dafür muss die gemessene Fluoreszenzzählrate mit Hilfe der Modellgleichung auf die berechnete Anzahl der Moleküle im Detektionsvolumen² normiert werden (Gleichung 3.2-6).

$$F_{cpm}(FCS) = \frac{F}{N} \quad 3.2-6$$

N = Anzahl der Fluorophore

F = Fluoreszenzsignal, mit F = Detektorzählrate-Untergrundsignal

Unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Modellgleichungen für FCS (Gleichung 3.2-11 und 3.2-73) gilt für $F_{cpm}(FCS)$ Gleichung 3.2-7. Dabei ist zu beachten, dass die durch die Fluoreszenzsignalsättigung bedingte Verzerrung des Detektionsvolumens zu einer Änderung der Diffusionsamplitude und damit auch von $F_{cpm}(FCS)$ führt (Kapitel 2.4.2).

$$F_{cpm}(FCS) = \frac{F}{N} = \frac{F \cdot (1 - A_{T,R^-})}{N_{S,R}} \quad 3.2-7$$

$N_{S,R}$ = Anzahl der Fluorophore in Singulett- und Radikalzustand

F = Fluoreszenzsignal

N = Anzahl der Fluorophore

A_{T,R^-} = Summierte Amplitude der Triplett- und Radikalanionterme

Zu beachten ist, dass die Diffusionsamplitude von dem Untergrundsignal (siehe dazu Kapitel 3.2.3.4) beeinflusst wird, und deswegen $F_{cpm}(FCS)$ zusätzlich korrigiert werden muss.

3.2.3.14 Bestimmung der Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$

Bei Messungen an einem konfokalen Fluoreszenzaufbau mit frei durch das Detektionsvolumen diffundierenden Fluorophoren, können die Fluorophore, die sich im langlebigen (oder irreversiblen) nicht fluoreszierenden Zustand befinden, schnell gegen Fluorophore, die sich im Singulettgrundzustand, befinden ausgetauscht

¹ Das aus FCS -Messungen bestimmte Fluoreszenzsignal eines einzelnen Fluorophors, entspricht nicht zwangsläufig dem Fluoreszenzsignal, das bei einem Experiment mit einem einzelnen Fluorophor erwartet wird (siehe dazu Kapitel 3.2.8).

² Die Anzahl der Moleküle im Detektionsvolumen entspricht der inverse Amplitude des Diffusionsterms einer FCS -Modellgleichung

werden. Dies hat zur Folge, dass die Austauschrate die Fluoreszenzzählrate beeinflusst. Gleichzeitig ist die Austauschrate von der Größe des Detektionsvolumens und dementsprechend von der Konfiguration des verwendeten Fluoreszenzaufbaus abhängig. Um die Fluoreszenzzählrate unabhängig von der Konfiguration des verwendeten Fluoreszenzaufbaus betrachten zu können, wird im Rahmen der Zusammenfassung der Ergebnisse (Kapitel 3.2.8.2) die Fluoreszenzzählrate unter den Bedingungen, bei denen die Austauschrate vernachlässigbar ist, betrachtet. Zusätzlich sind die direkt aus *FCS*-Messungen bestimmte Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(FCS)$ speziell bei höheren Anregungsleistungsdichten stark verzerrt (Kapiteln 2.4.2, 3.2.5.2 und 3.2.5.3). Die für die Korrektur $F_{cpm}(FCS)$ notwendigen Messungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht für alle Messreihen durchgeführt werden. Deswegen wird eine Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$ mit Hilfe der Gleichung 3.2-44¹ (Seite 103) ausgerechnet. Die auf diese Weise bestimmte Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$ ² repräsentiert die „ideale“ Fluoreszenzzählrate eines immobilisierten Fluorophors, die nicht von der fluoreszenzsignalsättigungsbedingten Verzerrung des Detektionsvolumens (Kapitel 2.4.2) beeinflusst wird.

Für die Bestimmung der für Gleichung 3.2-44 notwendigen Besetzungswahrscheinlichkeit S_{1eq} wird das hergeleitete kinetische Modell *Modell 3a* (Gleichungen 3.2-57-3.2-61) mit auf $k_{diff} = 0$ fixierter³ Austauschrate und der unter *FCS*-Messbedingungen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten verwendet (*Tabelle 3.2-14*, Seite 136).

¹ Für die Detektionseffizienz wird $G_{detect} = 0.02$ eingesetzt. (Kapitel 3.2.3.11)

² Einen qualitativen Vergleich zwischen direkt gemessenen $F_{cpm}(FCS)$, bzw. $F_{cpm}(FCS,corr)$ und berechneten $F_{cpm}(ideal)$ bei allen durchgeführten Messreihen (siehe Kapitel 5.7)

³ Aufgrund der Tatsache, dass k_{diff} im Rahmen des Modells mit Radikalkation und Photozerstörung (Kapitel 3.2.4.1) allein im Nenner der Gleichung 3.2-16 steht, konnte k_{diff} nicht einfach auf null gesetzt werden. Stattdessen wurde ein sehr kleiner Wert für Austauschrate von $k_{diff} = 10^{-20} \text{ s}^{-1}$ verwendet. Zu beachten ist, dass bei gegen Null strebender Austauschrate alle Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung auch zwangsläufig auf null fixiert werden müssen, weil die Herleitung alle in dieser Arbeit präsentierten kinetischen Modelle unter der Voraussetzung eines Gleichgewichtszustands erfolgten (vergl. Kapitel 5.1), und im Falle der Photozerstörung kann der Gleichgewichtszustand nur aufgrund der Diffusion der Moleküle in das Anregungsvolumen von außerhalb des Anregungsvolumens erreicht werden.

3.2.3.15 Anpassung des Fluoreszenzsignals am FCS-Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) bei Verwendung von Emissionsfiltern

Tabelle 3.2-6 Anpassung des Fluoreszenzsignals am FCS-Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) bei Verwendung von Emissionsfiltern. Alle F_{cpm} -Daten beziehen sich auf *Rh 110* mit dem Emissionsfilter AHF, HQ 533/46, da dieser Filter sich grundsätzlich im Strahlengang befand. Alle anderen Filter wurden zusätzlich verwendet um Signalsättigung an den Detektoren bei hohen Anregungsleistungen zu verhindern. Bei Bedarf können F_{cpm} -Daten auf das gesamte Fluoreszenzspektrum der Rhodamine umgerechnet werden. Hierfür müsste bei *Rh 110* der Faktor 1.59 bzw. bei *Rh 123* der Faktor 1.56 verwendet werden.

Filter	Skalierungsfaktor	
	<i>Rh 110</i>	<i>Rh 123</i>
AHF, HQ 533/46	1	0.98
Thorlabs, NE03B	2	2
Thorlabs, NE10B	10	10

Bei der Berechnung des Fluoreszenzsignals im Zusammenhang mit Messungen der Farbstoffe *Rh 110* und *Rh 123* wurde das Fluoreszenzsignal abhängig vom verwendeten Emissionsfilter mit einem Faktor multipliziert (siehe Tabelle 3.2-6)

3.2.3.16 Fluoreszenzaufbau für Messungen der Photozerstörung (Fluoreszenzaufbau für Photozerstörung)

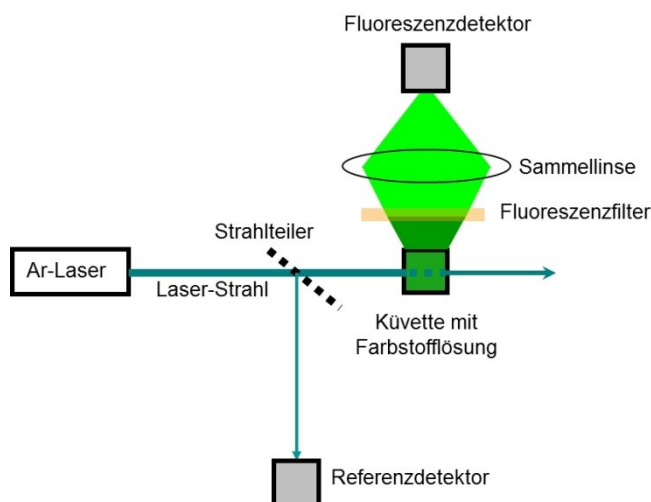


Abbildung 3.2-9 Schematische Darstellung des Küvettenaufbaus für die Messungen der Photozerstörung.

Für Messungen der Geschwindigkeit der Photozerstörung wurde ein in der Literatur beschriebener Fluoreszenzaufbau verwendet [28, 39]. Als Lichtquelle wurde ein Argon-Ionen-Laser (Sabre Innova, Coherent, $\lambda = 496.5$ nm) eingesetzt. Das

Anregungslicht wurde unfokussiert auf die Probe eingestrahlt. Bei einem Strahldurchmesser von $d = 0.3 \text{ cm}$ und der Anregungsleistung von $P = 1 \text{ W}$ betrug die Leistungsdichte bei den Messungen der Photozerstörung $\langle I \rangle = 14 \text{ W/cm}^2$.

Die Fluoreszenz wurde senkrecht dazu über eine Sammellinse auf den Detektor (*S1226-8BQ*, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) abgebildet. Ein Bandpass Fluoreszenzfilter (*AHF, HQ 520/35*) in Kombination mit einem Kantenfilter (*Schott, OG 515*) dienten der Blockung des Streulichts. Um eventuelle Intensitätsschwankungen zu kompensieren, wurde mittels eines Strahlteilers (Quarzplatte) ein Teil des Anregungsstrahls auf einen Referenzdetektor umgeleitet. Die Signale der Detektoren wurden über einen Analog-Digital-Wandler (*PC-Einsteckkarte (WIN-30D*, Meilhaus, Puchheim)) in einen PC verarbeitet und als ASCII-Datei gespeichert.

3.2.3.17 Messungen der Photozerstörung

Bei den Messungen der Photozerstörung befand sich die Probe in einer 3 mL Quarzküvette (Hellma), die mittels eines Thermostaten auf konstanter Temperatur von $T = 20^\circ \text{ C}$ gehalten wurde.

Die Probe wurde während der Messungen mit einem Magnetrührer gerührt. Die Rührgeschwindigkeit wurde so eingestellt, dass sie schneller war als die Photozerstörung. Daher konnte für die bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung notwendige bestrahltes Volumen V_{ill} (Kapitel 1.2.1) das gesamte Volumen der Probe in der Küvette eingesetzt werden (vergleiche Gleichung 1.2-3). Die Auswertung der Messungen konnte dadurch deutlich erleichtert werden, weil weder die Diffusion der Fluorophore noch das Profil des Laserstrahls in dem Fall für die Auswertung relevant sind.

3.2.3.18 Küvetten für Messungen unter sauerstofffreien Bedingungen

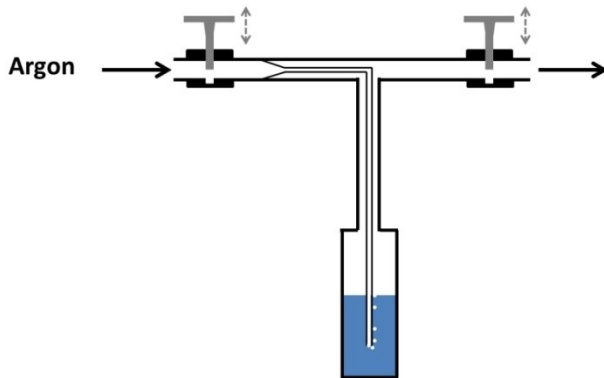


Abbildung 3.2-10 Schematische Darstellung einer Küvette für Messungen unter sauerstofffreien Bedingungen. Um sauerstofffreie Bedingungen herzustellen wurde 30 Minuten lang Argon durch die Küvette geleitet. Danach wurde die Küvette mit den Hähnen verschlossen.

Für die Messungen der Photozerstörung unter sauerstofffreien Bedingungen wurden spezielle Küvetten benötigt. Die schematische Darstellung einer solchen Küvette ist in Abbildung 3.2-10 zu finden.

3.2.3.19 Adsorption und Desorption der Farbstoffe an der Küvettenwand

Bei den Messungen in einer Küvette wurden Farbstoffkonzentrationen von $c \leq 100 \text{ nM}$ eingesetzt. Bei solchen niedrigen Konzentrationen kann die Adsorption und die Desorption der *Rh 123* Moleküle an den Küvettenwänden die beobachtete Abnahme der Farbstoffkonzentration beeinflussen. Damit muss das Gleichgewicht zwischen adsorbierten und gelösten Farbstoffen mit der Geschwindigkeitskonstanten für Adsorption und Desorption (k_{ads} , k_{des}) (Abbildung 3.2-11) bei der Photozerstörung mitberücksichtigt werden.

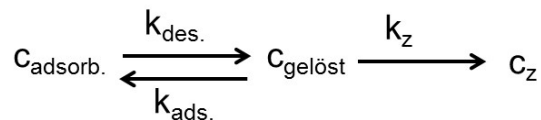


Abbildung 3.2-11 Reaktionsgleichung für die Abnahme der Konzentration des Farbstoffs mit der Geschwindigkeitskonstante k_z und einem vorgelagerten Gleichgewicht. Das Gleichgewicht beschreibt die Adsorption und Desorption des Farbstoffes an den Küvettenwänden mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{ads} und k_{des} .

Die Änderung der Konzentration $c_{gelöst}$ kann in diesem Fall mit einer biexponentiellen Funktion der Form

$$c_{gelöst}(t) = A \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + B \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad 3.2-8$$

beschrieben werden [28, 65]. Wobei für die Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung k_z gilt $k_z = k_l$ wenn $k_z \ll k_{des}/k_{ads}$ und $k_l \ll k_2$ [28].

3.2.3.20 Abnahme der Intensität aufgrund der Lichtabsorption in einer Küvette

Weil das Laserlicht auf dem Weg durch die Lösung absorbiert wird, ändert sich die Anregungsleistung innerhalb der Küvette. Die mittlere Anregungsleistung kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet werden. Analog zur Intensität gilt für die Leistungsdichte Gleichung 3.2-9 (vergleiche Gleichung 1.1-1)

$$P = P_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot b_c} \quad 3.2-9$$

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

P = Anregungsleistung

b_c = optische Weglänge

Die mittlere Intensität P_{av} in der Küvette ist dann:

$$P_{av} = \frac{P_0 \int_0^{b_c} 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot b_c} db_c}{b_c} = \frac{P_0 (1 - 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot b_c})}{\varepsilon \cdot c \cdot b_c \cdot \ln 10} \quad 3.2-10$$

Bei der Anfangskonzentration des *Rh 123* von $c_0 = 0.1 \mu\text{M}$, $b_c = 1 \text{ cm}$ und $\varepsilon_{\lambda = 495.5 \text{ nm}} = 80000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ gilt für die mittlere Intensität $P_{av} = 0.99 \cdot P_0$. Für den stärker konzentrierten Triplettlöcher *AZB-C* mit $c_0 = 100 \mu\text{M}$ und $\varepsilon_{\lambda = 495.5 \text{ nm}} = 250 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ergibt sich $P_{av} = 0.97 \cdot P_0$. Für den Triplett- und Radikal-löcher *A-AZB-C* bei $c = 100 \mu\text{M}$ und $\varepsilon_{\lambda = 495.5 \text{ nm}} = 1700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ergibt sich $P_{av} = 0.83 \cdot P_0$. (Verbindungen *AZB-C* und *A-AZB-C* siehe Kapitel 5.11 und Kapitel 5.12)

3.2.4 Auswertung der FCS-Messungen von Rh110 ohne Additive und in Gegenwart von AZB-C

3.2.4.1 Darstellung der Modelle und Modellfunktionen

Wie bereits im Kapitel 3.2.2 beschrieben, wird in Gegenwart von Sauerstoff eine sehr starke Löschung des Radikalanionzustands beobachtet. Damit kann angenommen werden, dass in der luftgesättigten Lösung die Population des Radikalanions vernachlässigbar bleibt, solange keine großen Konzentrationen eines Reduktionsmittels anwesend sind.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Additiven kann nur beim *AZB-C* davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit des Additivs keiner zusätzlichen Besetzung des Radikalanionzustands zufolge haben kann. Der Grund dafür ist die thermodynamisch verbotene Reduktion des S_I - bzw. T_I -Zustands durch das *AZB-C* (Kapitel 3.2.3.5). Die Abwesenheit des Radikalanionzustands erlaubt es bei der Auswertung der Messungen von *Rh 110* ohne Additive bzw. bei der Auswertung der Messungen in Gegenwart des Additivs *AZB-C* auf das gleiche elektronische Zustandsmodell ohne des Radikalanionzustands zurückzugreifen.

Um die Auswirkung des Additivs *AZB-C* auf das *Rh 110* zu untersuchen, wurden *FCS*-Messungen bei verschiedenen Anregungsleistungen im Bereich von $\langle I \rangle = 1\text{-}1000 \text{ kW/cm}^2$ an frei durch das Konfokalvolumen diffundierenden Fluorophoren mit und ohne Additiv vorgenommen. Für die Auswertung der *FCS*-Messungen wurde eine Modellgleichung mit drei Korrelationstermen (Diffusionsterm, Tripletterm, Radikalkationterm (Gleichung 3.2-11)) verwendet.

$$G(t_c) = \frac{1}{N_{S,R}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D}}} \cdot G_T(t_c) \cdot G_R(t_c) \quad 3.2-11$$

$$G_T(t_c) = \left(1 - A_T + A_T \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_T}\right) \right)$$

$$G_R(t_c) = \left(1 + A_{R^+} \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_R}\right) \right)$$

mit

$$A_{R^+} = \frac{A_{R^+(norm)}}{1 - A_{R^+(norm)}}$$

$G_T(t_c)$ = Triplettterm

$G_R(t_c)$ = Radikalkationterm

$N_{S,R}$ = Anzahl der Fluorophore in Singulett- und Radikalzustand

t_c = Korrelationszeit

t_d = Diffusionszeit

t_R = Radikalrelaxationszeit

A_{R^+} = Radikalkationsamplitude

$A_{R^+(norm)}$ = normierte Radikalamplitude

t_T = Triplettrelaxationszeit

A_T = Triplettamplitude

z_0/ω_0 = Parameter, die das konfokale Messvolumen charakterisieren (z_0 = Radius des Detektionsvolumens entlang der z-Achse, ω_0 = Radius des Detektionsvolumens in der x-y Ebene)

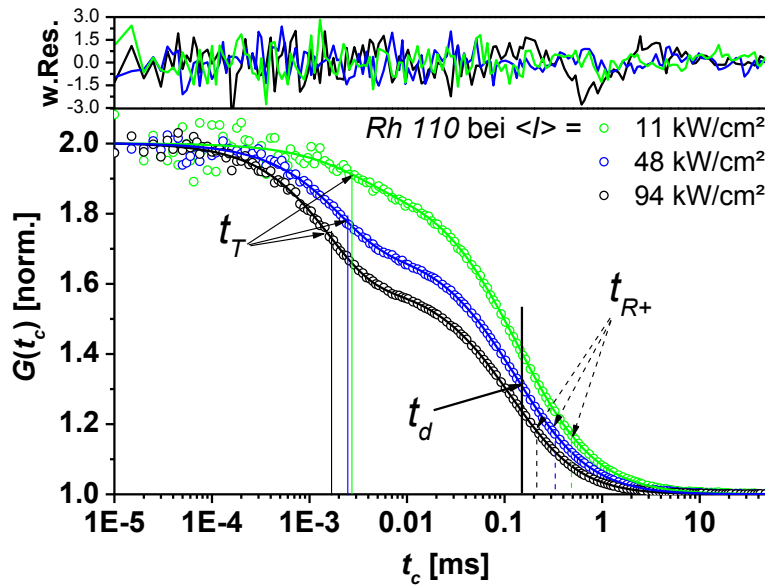


Abbildung 3.2-12 FCS-Daten von *Rh 110* (Punkte) in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) bei verschiedenen Leistungsdichten. Die Anpassung der Gleichung 3.2-11 (durchgezogene Linien) liefert die Diffusionszeit t_d und die Relaxationszeiten von Triplett- und Radikalkationzuständen (t_T , t_{R^+}).

Die Triplettrelaxationszeiten (t_T) von *Rh 110* ohne Additive liegen je nach Leistungsdichte im Bereich von $t_T = 1\text{--}2.6\ \mu\text{s}$ (Abbildung 3.2-12). Da *A-AZB* in der Lage ist die Energie des Triplettzustands von Rhodaminen mittels eines Elektronenaustausches aufzunehmen [24], wird eine sinkende t_T mit steigender Konzentration des Additivs beobachtet (Abbildung 3.2-13). In Gegenwart von einer

Additivkonzentration von $[Q]_{AZB-C} \approx 1 \text{ mM}$ und einer Leistungsdichte von $\langle I \rangle \approx 10^5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ sinkt die Triplettrelaxationszeit bis auf $t_T \approx 200 \text{ ns}$.

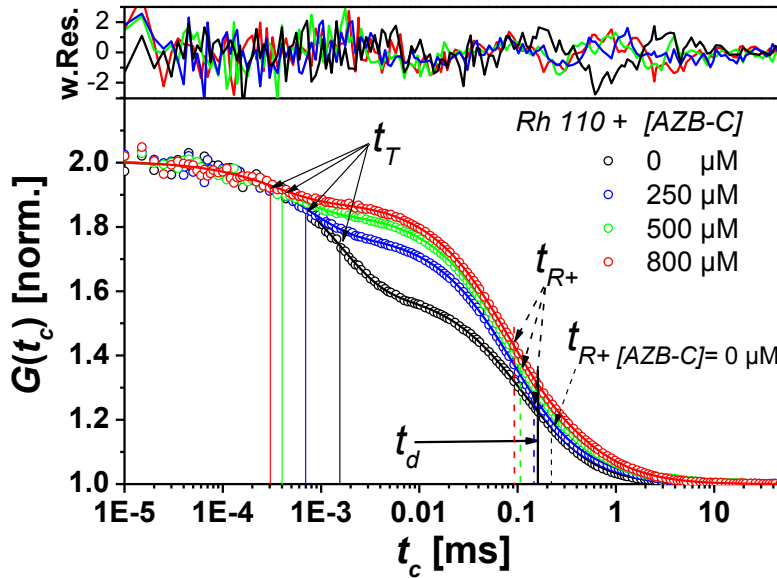


Abbildung 3.2-13 FCS-Daten (Punkte) von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart des Additivs *AZB-C* bei einer Leistungsdichte von $\langle I \rangle \approx 100 \pm 10 \text{ kW/cm}^2$. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassung der Gleichung 3.2-11 an die FCS-Daten.

Die Radikalkationsrelaxationszeit (t_{R+}) von *Rh 110* ohne Additive liegt im Bereich von $t_{R+} = 0.2 - 0.6 \text{ ms}$, gleichzeitig bewirkte die Anwesenheit des Additivs *AZB-C* eine Verkürzung von t_{R+} um weniger als eine Größenordnung (Abbildung 3.2-13).

Um die Korrelationsterme der einzelnen elektronischen Zustände auswerten zu können ist eine kinetische Betrachtung der Besetzungswahrscheinlichkeiten dieser Zustände erforderlich. Die kleine Relaxationsrate des Radikalkationszustands der Rhodamine ($k_{red} \approx 10^3 \text{ s}^{-1}$ [24, 62-64, 73]), die in der gleichen Größenordnung wie die Austauschrate ($k_{diff} \approx 8000 \text{ s}^{-1}$) mit der die Fluorophore in das Detektionsvolumen hinein bzw. heraus diffundieren liegt, führt dazu, dass auch die Diffusion in die kinetische Betrachtung der elektronischen Zustände einbezogen werden muss¹.

¹ Die Lebensdauer des Radikalzustands kann länger sein als die Zeit, die der Fluorophor braucht, um durch das Detektionsvolumen zu diffundieren. Dies kann eventuell zu einer Anreicherung des Radikalkations in der unmittelbaren Umgebung des Detektionsvolumen führen. Da bei der Auswertung der FCS-Messungen die Korrelationsamplituden aller Zustände relativ zur Gesamtamplitude der Modell-Gleichung (Gleichung 3.2-11) bestimmt werden, kann diese Anreicherung bei der Auswertung der Korrelationsamplituden vernachlässigt werden.

Das kinetische Modell mit Singulettzustand, Triplettzustand, Radikalkationenzustand, Diffusion und Photozerstörung (Modell 1a)

Das kinetische Modell mit Singulett-, Triplett-, Radikalkationenzuständen, Photozerstörung und Diffusion ist in Abbildung 3.2-14 dargestellt. Die gestrichelten Pfeile in Abbildung 3.2-14 repräsentieren Prozesse, die für das gesamte Modell notwendig sind, deren Geschwindigkeitskonstanten bei *Rh 110* nicht bekannt sind, und im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnten. Um das kinetische Modell trotz der unbekannten Geschwindigkeitskonstanten für die Relaxation und die Anregung der höher angeregten Zustände analytisch zu beschreiben, wurde angenommen, dass die Relaxation höher angeregter Zustände deutlich schneller ist als deren Anregung, und dass die Photozerstörung grundsätzlich deutlich langsamer ist als die übrigen Relaxationsprozesse. Damit können die höher angeregten Zustände jeweils mit den direkt darunter liegenden Zuständen zu einem entsprechenden Zustand ($R^{\bullet+} = R_I^{\bullet+} + R_n^{\bullet+}$, $T = T_I + T_n$, $S = S_I + S_n$) zusammengefasst werden. Mit einer Annahme, dass bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Leistungsdichten die Sättigung der höher angeregten Zustände niemals erreicht wird, kann für alle Prozesse, die aus einem beliebigen angeregten Zustand ausgehen eine gesamte Geschwindigkeitskonstante nach Gleichung 3.2-12 definiert werden. Zusätzlich wird angenommen, dass die Relaxation des Radikalkationenzustands nur in den S_0 -Zustand führen kann¹.

¹ Der Grund für diese Annahme ist die im Vergleich zu den Relaxationen der Singulett- und Triplett-Zustände langsame Relaxation des Radikalkations.

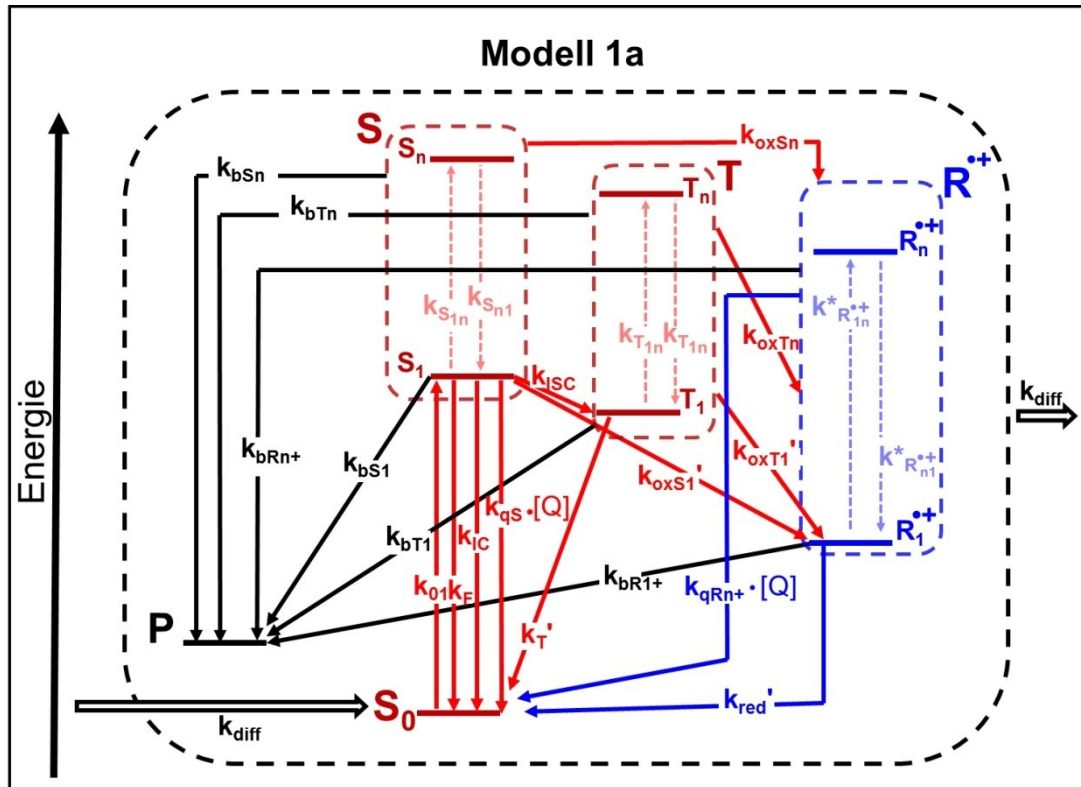


Abbildung 3.2-14 Kinetisches Modell eines Fluorophors mit Singulett-, Triplett-, Radikalkation-zuständen, Diffusion und der Photozerstörung aus jedem der angeregten Zustände. Der Zustand P repräsentiert Produkte der irreversiblen Photozerstörung. Die durchgezogenen Pfeile repräsentieren alle für die nachfolgende Herleitung relevanten Prozesse. Die gestrichelten Pfeile repräsentieren Prozesse die für das gesamte Modell notwendig sind, deren Geschwindigkeitskonstanten aber nicht im Rahmen dieser Arbeit bestimmt werden konnten. Die Besetzung der höher angeregten Zustände wird dennoch berücksichtigt, in dem die Geschwindigkeitskonstanten für die Prozesse, die aus den höher angeregten Zuständen ausgehen, zusätzlich mit der Leistungsdichte multipliziert werden. Dabei wird für alle höher angeregten Zustände angenommen, dass deren Relaxation deutlich schneller als deren Anregung verläuft.

Damit die Abbildung übersichtlich bleibt wird bei der Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten, die eine Form $k_{Xn} \cdot \langle I \rangle$ haben, auf $\langle I \rangle$ verzichtet.

$$kX_{tot} = kX_1 + kX_n \cdot \langle I \rangle$$

3.2-12

kX_{tot} = gesamte Geschwindigkeitskonstante eines Prozesses aus dem Zustand X

X_1 = erster angeregter elektronischer Zustand X

X_n = höher angeregter elektronischer Zustand X

$\langle I \rangle$ = Leistungsdichte

Die analytische Lösung für die Besetzungswahrscheinlichkeiten aller Zustände (S_0 , S , T , R^{*+} und P) unter Stationaritätsbedingung ist durch Gleichungen 3.2-13-3.2-17 gegeben (Herleitung siehe Kapitel 5.1.3).

$$S_{0eq} = S_{1eq} \cdot K_{S0} \quad 3.2-13$$

mit,

$$K_{S0} = \frac{k_{diff} + k_0' + k_{oxStot} + k_{bStot}}{k_{01}},$$

$$k_0' = k_{ISC} + k_F + k_{IC} + k_{qS} \cdot [Q] \text{ (vergleiche Gleichung 1.1-9 bzw. 1.1-10)}$$

$$T_{1eq} = S_{1eq} \cdot K_{T1} \quad 3.2-14$$

mit,

$$K_{T1} = \frac{k_{ISC}}{k_T' + k_{diff} + k_{oxTtot} + k_{bTtot}}$$

$$R_{eq}^{*+} = S_{1eq} \cdot K_{R+} \quad 3.2-15$$

mit,

$$K_{R+} = \frac{K_{T1} \cdot k_{oxTtot} + k_{koxtot}}{k_{redtot}' + k_{diff} + k_{bRtot}}$$

$$P_{eq} = S_{1eq} \cdot K_P \quad 3.2-16$$

$$K_P = \frac{k_{bStot} + K_{R+} \cdot k_{bRtot} + K_{T1} \cdot k_{bTtot}}{k_{diff}}$$

$$S_{\text{leq}} = \frac{1}{1 + K_{S0} + K_{T1} + K_{R+} + K_P} \quad 3.2-17$$

Das kinetische Modell mit nur Singulettzustand und Triplettzustand (Modell 2)

Die Relaxationszeiten des Triplettterms (t_T siehe Gleichung 3.2-11) bei *FCS*-Messungen von *Rh 110* ohne Additive und *FCS*-Messungen von *Rh 110* mit *AZB-C* waren mehrere Größenordnungen länger im Vergleich zu allen anderen beobachteten Prozessen (vergl. Abbildung 3.2-13). Deswegen kann der Triplettterm unabhängig von der Austauschrate, Oxidations- bzw. Reduktions-Prozessen und Photozerstörung betrachtet werden. In diesem Zusammenhang reduziert sich das in Abbildung 3.2-1 dargestellte Zustandsmodell auf einen 5-Zustände-Modell (Abbildung 3.2-15) [65].

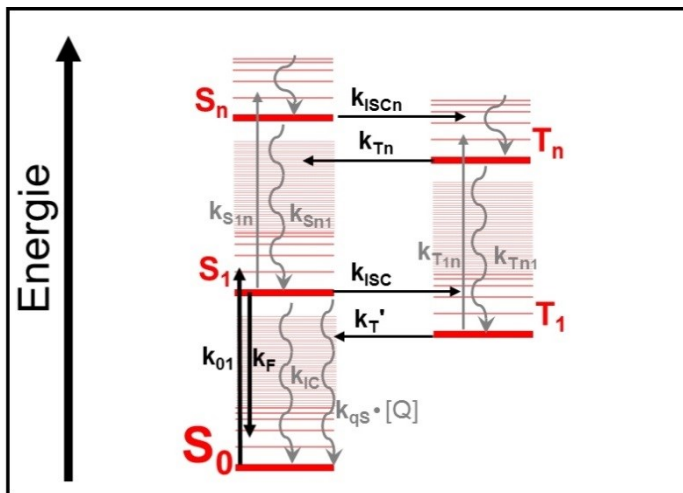


Abbildung 3.2-15 Das 5-Zustände-Modell bestehend aus Triplett- und Singulettzuständen [65].

Aufgrund der schnellen Relaxation der höher angeregten Zustände sind deren Besetzungswahrscheinlichkeiten mehrere Größenordnungen kleiner als die Besetzungswahrscheinlichkeiten der ersten angeregten Zustände. Dies führt dazu, dass bei der Auswertung des Triplettterms die höher angeregten Zustände vernachlässigt werden können. Daher wird bei der Auswertung des Triplettterms ein einfaches Modell bestehend nur aus S_0 -, S_1 - und T_1 -Zuständen (Modell 2 Abbildung 3.2-16) verwendet.

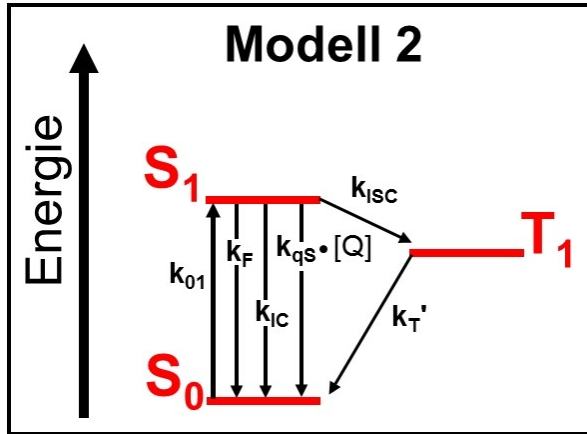


Abbildung 3.2-16 Vereinfachtes kinetisches Modell für die Auswertung des Triplettterms.

Für die stationäre Besetzungswahrscheinlichkeiten S_{1eq} und T_{1eq} gelten damit Gleichungen 3.2-18 und 3.2-19 [65].

$$S_{1eq} \approx S_{1eq(3z)} = \frac{k_{01} \cdot k_T'}{k_{01} \cdot (k_{ISC} + k_T') + k_0' \cdot k_T'} \quad 3.2-18$$

$$T_{1eq(3z)} \approx S_{1eq(3z)} \cdot \frac{k_{ISC}}{k_T'} \quad 3.2-19$$

mit,
 $k_0' = k_{ISC} + k_F + k_{IC} + k_{qs} \cdot [Q]$

„3z“ steht für drei Zustände Modell (Modell 2) bestehend aus S_0 , S_1 , T_1 -Zuständen (Abbildung 3.2-16)

Die analytische Beschreibung der Relaxationszeiten und Amplituden des Triplettterms einer Korrelationsfunktion für das kinetische Modell mit drei Zuständen (S_0 , S_1 , T_1) ist durch Gleichung 3.2-20 bzw. 3.2-21 gegeben [65].

$$t_T = \frac{k_{01} + k_0'}{(k_{ISC} + k_T') \cdot k_{01} + k_T' \cdot k_0'} \quad 3.2-20$$

$$A_T = T_{1eq} = \frac{k_{01} \cdot k_{ISC}}{k_{01} \cdot (k_{ISC} + k_T') + k_0' \cdot k_T'} \quad 3.2-21$$

$$k_T' = k_{T0} + k_{qT} \cdot [Q] \quad 3.2-22$$

Bei der Annahme der Unabhängigkeit des Triplettterms vom Radikalkationterm ist zu beachten dass diese Annahme nur bei niedrigen Anregungsleistungen gemacht werden kann. Bei höheren Leistungsdichten führt die Sättigung des Fluoreszenzsignals, die stark von der Lebensdauer des Radikalkationzustands abhängt, zu einer Verzerrung der Form des Detektionsvolumens, was eine Verzerrung der Form des Detektionsvolumens, mit daraus resultierender Verzerrung der Triplettamplituden und der Triplettrelaxationszeiten nach sich zieht (vergl. Kapitel 2.4.2). (Die Sättigung des Fluoreszenzsignals findet bei *Rh 110* im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle > 100 \text{ kW/cm}^2$ statt (siehe Kapitel 3.2.5.3)).

Das kinetische Modell mit langsamer Kinetik des Radikalkationzustands (Modell 1b)

Die deutlich schnellere Kinetik des Singulett- bzw. des Triplettzustands im Vergleich zur Kinetik des Radikalkationzustands erlaubt es die Kinetik des Radikalkationzustands getrennt von der Kinetik der Singulett- und der Triplett-Zustände zu betrachten. Damit lässt sich das kinetische Modell mit Singulett-, Triplett- Radikalkationzuständen und Photozerstörung (vergl. Abbildung 3.2-14) vereinfachen in dem alle Triplett- und Singulettzustände zu einem Zustand *ST* (Singulett und Triplett Zustand) zusammengefasst werden [24]. Die Zustände *ST* und R^{*+} stehen dabei miteinander im Gleichgewicht (Abbildung 3.2-17)¹.

¹ Das vereinfachte kinetische Modell mit dem zusammengefassten Zustand *ST* wird im Rahmen dieser Arbeit für die Auswertung des Korrelationsterms des Radikalkationzustands (siehe Kapitel 3.2.4.3, Kapitel 3.2.6.3, Kapitel 3.2.7.1) verwendet.

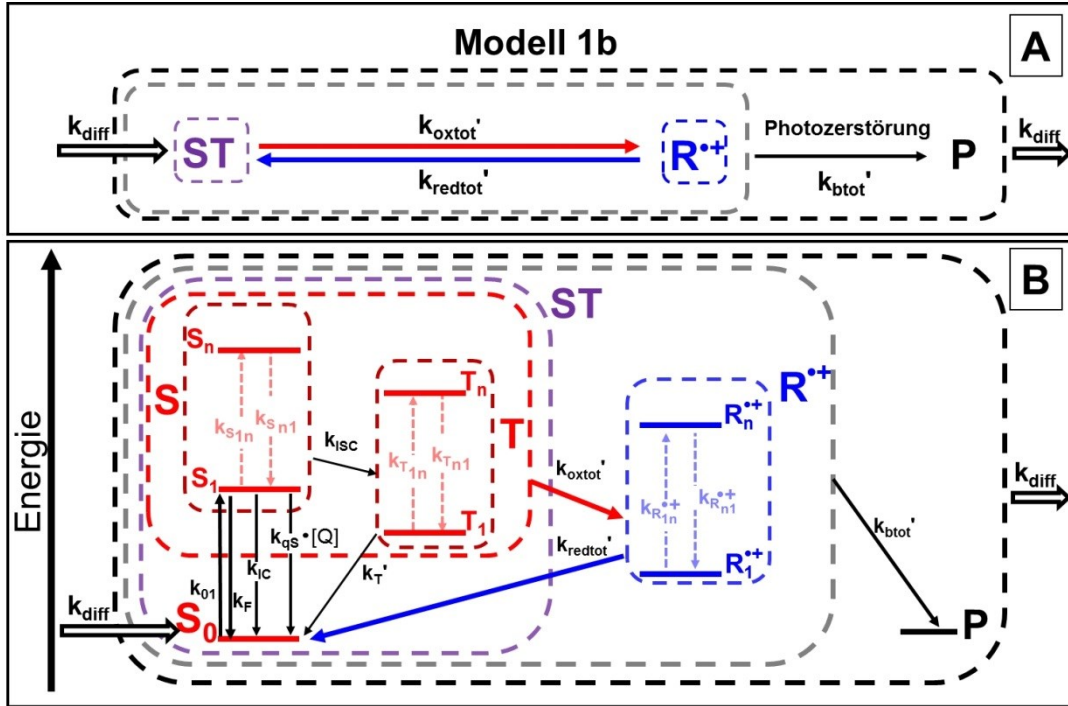


Abbildung 3.2-17 A: Das Gleichgewicht zwischen dem Radikalkationenzustand R^{+} , dem summierten Zustand ST (Singulett und Triplett Zustand) inklusive der Photozerstörung und Austauschrate k_{diff} (Modell 1b) [24]. Der Zustand P repräsentiert Produkte der irreversiblen Photozerstörung aus allen angeregten Zuständen (Gleichung 3.2-29, Vergleiche Abbildung 3.2-14).

B: Detaillierte Darstellung der Reaktionspfade des Modells 1b. Die höher angeregten Zustände sind mit den darunterliegenden zu einem Zustand (S , T und R^{+}) zusammengefasst. Die durchgezogenen Pfeile repräsentieren alle für die nachfolgende Herleitung relevanten Prozesse. Die gestrichelten Pfeile repräsentieren Prozesse, die für das gesamte Modell notwendig sind, deren Geschwindigkeitskonstanten aber nicht im Rahmen dieser Arbeit bestimmt werden können. Die Besetzung der höher angeregten Zustände wird dennoch berücksichtigt, in dem die Geschwindigkeitskonstanten für die Prozesse, die aus den höher angeregten Zuständen ausgehen, zusätzlich mit der Leistungsdichte multipliziert werden. Dabei wird für alle höher Angeregte Zustände angenommen, dass deren Relaxation deutlich schneller als deren Anregung verläuft.

Um zu berücksichtigen, dass die Besetzung des Radikalkationenzustands nur bei einer Anregung des Fluorophors erfolgen kann, werden die Geschwindigkeitskonstanten für die Prozesse aus den S_I - und T_I -Zuständen mit den Besetzungswahrscheinlichkeiten der entsprechenden Zustände multipliziert. Damit gilt für die gesamte Geschwindigkeitskonstante k_{oxtot}' Gleichung 3.2-23 [24].

$$\begin{aligned}
 k_{oxtot}' &= (k_{oxS1} + k_{qoxS1} \cdot [Q]) \cdot S_{1eq} + (k_{oxT1} + k_{qoxT1} \cdot [Q]) \cdot T_{1eq} + k_{oxSn} \cdot S_{neq} + k_{oxTn} \cdot T_{neq} \\
 &= k_{oxS1}' \cdot S_{1eq} + k_{oxT1}' \cdot T_{1eq} + k_{oxSn} \cdot S_{neq} + k_{oxTn} \cdot T_{neq}
 \end{aligned} \quad 3.2-23$$

X_{eq} = Besetzungswahrscheinlichkeit des elektronischen Zustands X unter Gleichgewichtsbedingungen
 $[Q]$ = Konzentration des Additivs

Unter der Berücksichtigung von einer sehr schnellen Relaxation aus den höher angeregten Zustände, wobei angenommen wird, dass $T_{eq} \approx S_{eq} \cdot k_{ISC} / k_T'$, gilt für k_{oxtot}' Gleichung 3.2-24

$$k_{oxtot}' = \left(k_{oxS1}' + k_{oxT1}' \cdot \frac{k_{ISC}}{k_T'} + \left(k_{oxSn} + k_{oxTn} \cdot \frac{k_{ISC}}{k_T'} \right) \cdot \langle I \rangle \right) \cdot S_{1eq(3z)} \quad 3.2-24$$

Die Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation aus den ersten angeregten Zuständen zu einer Geschwindigkeitskonstante k_{ox0} und aus den höher angeregten Zuständen zu einer Konstante k_{oxn} führt zur Gleichung 3.2-25

$$k_{oxtot}' = (k_{ox0}' + k_{oxn} \cdot \langle I \rangle) \cdot S_{1eq(3z)} \quad 3.2-25$$

mit,

$$k_{oxn} = k_{oxSn} + k_{oxTn} \cdot \frac{k_{ISC}}{k_T'} \quad 3.2-26$$

$$k_{ox0}' = k_{oxS1}' + k_{oxT1}' \cdot \frac{k_{ISC}}{k_T'} \quad 3.2-27$$

Die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion setzt sich entsprechend aus den Geschwindigkeitskonstanten der beiden beteiligten Zustände R_I^{*+} und R_n^{*+} zusammen¹. Unter der Annahme, dass die Relaxation des Zustands R_n^{*+} ebenfalls deutlich schneller ist, als dessen Anregung, kann seine Gleichgewichtspopulation als proportional zur Anregungsleistung angesehen werden. Damit gilt für die gesamte Geschwindigkeitskonstante der Reduktion des R^{*+} -Zustands k_{redtot}' Gleichung 3.2-28.

$$k_{redtot}' = k_{red0} + k_{qR+} \cdot [Q] + k_{qRn+} \cdot \langle I \rangle \cdot [Q] \quad 3.2-28$$

¹ Während bei den Zuständen S_n und T_n die Relaxationsraten ($k_{Tn1} \approx k_{Sn1} \approx 5 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$) so schnell sind, dass die additivabhängigen Konstanten $k_{qXn(Additiv)}$ vernachlässigt werden können, ist die Relaxationsrate des Zustands R_n^{*+} nicht bekannt. Ab einer Relaxationsrate von $k_{RIn^{*+}} < 10^{12} \text{ s}^{-1}$ und einer kleinen Konstante für die Reduktion des R_I^{*+} -Zustands von $k_{red0} \approx 10^3 \text{ s}^{-1}$ könnte die Additivabhängige Konstante k_{qRn+} eine Rolle bei der Reduktion des zusammengesetzten R^{*+} -Zustands spielen (siehe Kapitel 3.2.4.3).

k_{red0} = Additiv unabhängige Konstante für die Reduktion des R_l^{*+} -Zustands

k_{qR}^{+}, k_{qRn}^{+} = Additiv abhängige Konstante für die Reduktion des R_l^{*+} - bzw. R_n^{*+} -Zustands

Im Rahmen dieses Modells wird angenommen, dass die Photozerstörung sowohl aus dem Zustand ST als auch aus dem Zustand R^{*+} möglich ist. Darüber hinaus wird angenommen, dass sie sehr langsam im Vergleich zu allen andern Prozessen ist. Dies führt dazu, dass die Photozerstörung des Fluorophors das Gleichgewicht zwischen den Zuständen ST und R^{*+} nicht wesentlich beeinflusst [24, 65]. Die gesamte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung k_{btot} ist damit gegeben durch Gleichung 3.2-29.

$$k_{btot} = k_{bSTtot} + k_{bR^{*+}tot} = k_{bST} + k_{bSTn} + k_{bRl^{*+}} + k_{bRn^{*+}} \quad 3.2-29$$

$k_{bST}, k_{bRl^{*+}}$ = Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung aus den ersten angeregten Zuständen innerhalb der summierten Zustände ST und R^{*+}

$k_{bSTn}, k_{bRn^{*+}}$ = Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung aus den höher angeregten Zuständen innerhalb der summierten Zustände ST und R^{*+}

Die Besetzungswahrscheinlichkeit (ST_{eq}) des Zustandes ST unter Gleichgewichtsbedingungen und unter Berücksichtigung in der Abbildung 3.2-17 B dargestellten Prozesse (Diffusion und Photozerstörung) ist durch Gleichung 3.2-30 gegeben (Herleitung siehe Kap 5.1.1).

$$ST_{eq} = \frac{k_{diff} \cdot \left(1 + \frac{k_{bR^{*+}tot}}{k_{redtot}'} + \frac{k_{diff}}{k_{redtot}'} \right)}{\frac{k_{oxtot}' + k_{diff} + k_{bSTtot}}{k_{redtot}'} \cdot (k_{bR^{*+}tot} + k_{diff}) + k_{diff} + k_{bSTtot}} \quad 3.2-30$$

Die Besetzungswahrscheinlichkeit für den Radikalkationenzustand R^{*+} unter Gleichgewichtsbedingungen wird durch die Gleichung 3.2-31 beschrieben.

$$R_{eq}^{*+} = ST_{eq} \cdot \frac{k_{oxtot}' + k_{diff} + k_{bSTtot}}{k_{redtot}'} - \frac{k_{diff}}{k_{redtot}'} \quad 3.2-31$$

Ist die Photozerstörung deutlich langsamer als die Austauschrate ($k_{btot} \ll k_{diff}$), kann sie gänzlich vernachlässigt werden. Dadurch können Gleichung 3.2-30 und

Gleichung 3.2-31 zu Gleichung 3.2-32 bzw. Gleichung 3.2-33 vereinfacht werden (Herleitung siehe Kap 5.1.1).

$$ST_{eq} = \frac{k_{redtot}' + k_{diff}}{k_{redtot}' + k_{oxtot}' + k_{diff}} \quad 3.2-32$$

$$R_{eq}^{\bullet+} = ST_{eq} \cdot \frac{k_{oxtot}'}{k_{redtot}' + k_{diff}} \quad 3.2-33$$

Die analytische Beschreibung der Relaxationszeiten und Amplituden des Korrelationsterms des Radikalkationzustands für das elektronische Zustandsmodell mit getrennter Triplet und Radikalkation Kinetik ist durch Gleichungen 3.2-34-3.2-36¹ gegeben [24] (siehe auch Kapitel 5.1.2).

$$A_{R^+} = \frac{-\lambda_1(1 - ST_{eq}) - k_{oxtot}'}{(\lambda_2 - \lambda_1)ST_{eq}} \quad 3.2-34$$

$$\lambda_{1,2} = -k_{diff} + \frac{1}{2} \left(-k_{redtot}' - k_{oxtot}' - k_{bR+tot}' \pm X \right) \quad 3.2-35$$

mit,

$$X = \sqrt{k_{redtot}'^2 + k_{oxtot}'^2 + k_{bR+tot}'^2 - 2 \cdot k_{oxtot}' \cdot k_{bR+tot}'^2 + 2 \cdot k_{oxtot}' \cdot k_{redtot}' + 2 \cdot k_{redtot}' \cdot k_{bR+tot}'} \quad 3.2-36$$

t_R = Radikalrelaxationszeit
 A_{R^+} = Korrelationsamplitude des Radikalkationzustands

¹ Die analytische Beschreibung der Korrelationsamplitude und der Relaxationszeit des Radikalkations (Gleichungen 3.2-34-3.2-36) ist das Ergebnis einer Herleitung der Korrelationsamplitude des Radikalkationzustands und der Relaxationszeit des Radikalkationsterms für das kinetische Modell (Modell 1b) mit langsamen Radikalzustand und schnellen Triplet- und Singulett-Zuständen, die zu einem Zustand ST zusammengefasst sind (Abbildung 3.2-17). Da für die Korrelationsamplituden die Fluktuationen des Fluoreszenzsignals im Detektionsvolumen ausschlaggebend sind kann die Austauschrate k_{diff} aus der Relaxationszeit des Diffusionsterms berechnet werden (Gleichung 3.2-37)

3.2.4.2 Bestimmung von k_{ISC} , k_T und k_{qT} mittels Auswertung des Tripletterms der Fluoreszenzkorrelationskurven.

Die *Rh 110* spezifischen Konstanten für die Population und Depopulation des Tripletzustands (k_{T0} , k_{ISC}) können mittels globaler Anpassung der Gleichungen 3.2-20 und 3.2-21 (Modell 2) an die Amplituden und die Relaxationszeiten von *Rh 110* ohne Additive bestimmt werden.

Eine Anpassung der Amplituden und Relaxationszeiten im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 10\text{--}80\text{ kW/cm}^2$ (Abbildung 3.2-18, schwarze Linien) bei fixierten Konstanten der Anregung und Depopulation des S_1 -Zustands liefert die Werte $k_{T0} = 3.7 \cdot 10^5\text{ s}^{-1}$ und $k_{ISC} = 14 \cdot 10^5\text{ s}^{-1}$.

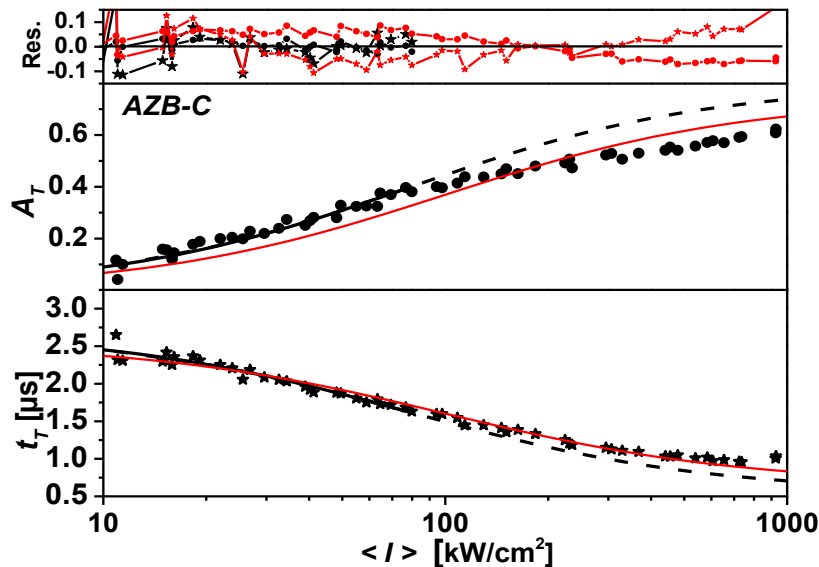


Abbildung 3.2-18 t_T - und A_T -Daten aus den FCS-Messungen von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive. Die durchgehenden Linien repräsentieren die globale Anpassung der Gleichung 3.2-20 bzw. 3.2-21 an t_T - und A_T -Daten. Die schwarzen Linien repräsentieren die Anpassung im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 10\text{--}80\text{ kW/cm}^2$. Die gestrichelten schwarzen Linien repräsentieren die Extrapolation der durchgehenden schwarzen Linien für den Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle > 80\text{ kW/cm}^2$, in dem die Sättigung des Fluoreszenzsignals (Kapitel 2.4.2) zu deutlichen Abweichungen der gemessenen Daten vom angepassten Modell führt. Die roten Linien repräsentieren die Anpassung im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 10\text{--}900\text{ kW/cm}^2$.

Bei Vernachlässigung des Einflusses der Sättigung (vergl. Kapitel 2.4.2) ergibt die gleiche Anpassung der Relaxationszeiten und der Amplituden im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 10\text{--}900\text{ kW/cm}^2$ (Abbildung 3.2-18, rote Linien) die Werte für die gleichen Geschwindigkeitskonstanten von $k_{T0} = 3.9 \cdot 10^5\text{ s}^{-1}$ und $k_{ISC} = 11 \cdot 10^5\text{ s}^{-1}$. Diese Werte stimmen mit bereits publizierten Werten für die

gleichen Geschwindigkeitskonstanten des *Rh 110*, die unter ähnlichen Bedingungen gemessen und auf gleiche Weise ausgewertet wurden gut überein ($k_{ISC} = 10 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ $k_T = 4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ [63]. Bereits publizierte Werte für die gleichen Geschwindigkeitskonstanten des *Rh 123* ($k_{ISC} = 7.6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ $k_T = 4.2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) wurden ebenfalls unter Vernachlässigung der Fluoreszenzsignalsättigung gewonnen [24]. Da bei Vernachlässigung von Sättigungseffekten die Triplettamplitude starke Abweichung zeigt (Abbildung 3.2-18), werden im Rahmen dieser Arbeit nur Triplettparameter von *Rh 110* verwendet, die aus Datenpunkten im Bereich niedrigen Leistungsdichten gewonnen wurden ($\langle I \rangle = 10\text{-}80 \text{ kW/cm}^2$).

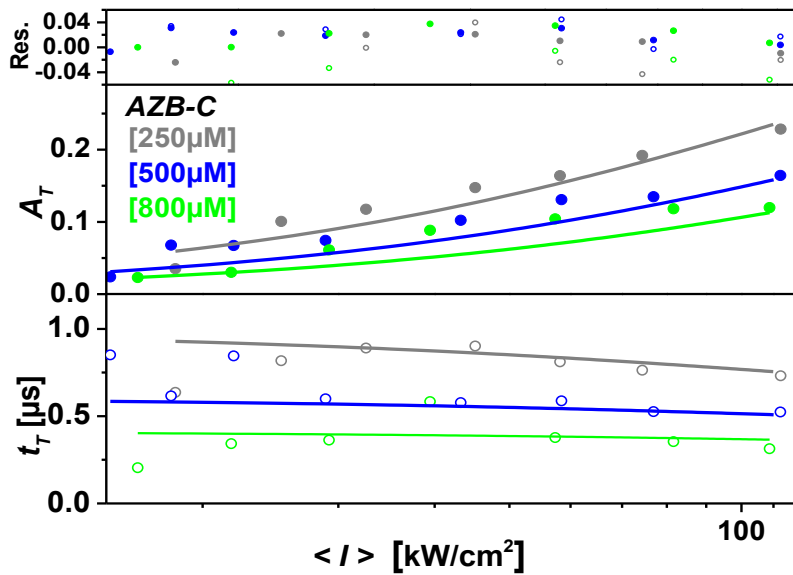


Abbildung 3.2-19 t_T - und A_T -Daten aus den FCS-Messungen von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) mit Additiv *AZB-C*. Die durchgehenden Linien repräsentieren die globale Anpassung der Gleichung 3.2-20 bzw. 3.2-21 an t_T - und A_T -Daten.

Bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Depopulation des Triplettzustands durch Additiv *AZB-C* ($k_{qT(AZB-C)}$) wurde die Anpassung der Gleichungen 3.2-20 und 3.2-21 an die Amplituden und die Relaxationszeiten von *Rh 110* verwendet (Abbildung 3.2-19). Die Konstante $k_{qT(AZB-C)}$ wurde global über alle Datenpunkte der Konzentrationsreihe von *AZB-C* ($[Q]_{AZB-C} = 250 \text{ µM}$, 500 µM , 800 µM , Abbildung 3.2-19) im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 5\text{-}120 \text{ kW/cm}^2$ angepasst.

Tabelle 3.2-7 Mittels Anpassung von Gleichungen 3.2-20 und 3.2-21 (Modell 2) an die Amplituden bzw. Relaxationszeiten des Triplettzustands bestimmte Triplettparameter. In Klammern sind die Standardfehler σ_n der Anpassung für den jeweiligen Parameter angegeben.

<i>Triplettparameter von Rh 110</i>	
$k_{ISC} [10^5 \cdot s^{-1}]$	$k_{T0} [10^5 \cdot s^{-1}]$
$14 (\pm 0.6)$	$3.7 (\pm 0.04)$
<i>AZB-C spezifische Löschkonstante $k_{qT} [10^9 M^{-1} s^{-1}]$ für Rh 110</i>	
$2.6 (\pm 0.1)$	

Die Rh 110 spezifischen Konstanten wurden auf die bereits bestimmten Werte $k_{T0} = 3.7 \cdot 10^5 s^{-1}$ und $k_{ISC} = 14 \cdot 10^5 s^{-1}$ fixiert. Die Anpassung lieferte den Wert für die additivspezifische Konstante von $k_{qT(Rh110, AZB-C)} = 2.6 \cdot 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$, der nah bei der maximalmöglichen diffusionskontrollierten Stoßrate ($k_{qdiff} \leq 7 \cdot 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$, Kapitel 5.9) zwischen dem Additiv und dem Farbstoff liegt. Das gleiche Additiv zeigt unter ähnlichen Bedingungen vergleichbare Wirkung auf Rh 123 ($k_{qT(Rh123, AZB-C)} = 3.6 \cdot 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$ [24]).

3.2.4.3 Bestimmung der Radikalkationparameter aus FCS-Messungen von Rh 110 ohne Additive und in Gegenwart von AZB-C

Die Relaxationszeiten des Radikalkationterms der FCS-Messungen von Rh 110 ohne Additive und mit dem Additiv AZB-C lagen dicht bei den Relaxationszeiten des Diffusionsterms, was die Bestimmung der Radikalkationparameter durch Anpassung von Gleichung 3.2-11 an die individuellen FCS-Messungen unmöglich machte.

Um den Radikalterm vom Diffusionsterm bei ähnlichen Relaxationszeiten zu trennen, wurde die Radikalkationrelaxationszeit (t_{R+}) und die Radikalkationsamplitude (A_{R+}) in der Gleichung 3.2-11 durch Gleichung 3.2-34 [24] und Gleichung 3.2-36 [24, 30] ersetzt (siehe auch Modell 1b (Abbildung 3.2-17)). Anschließend wurde die so erweiterte Gleichung 3.2-11 an Reihen von FCS-Messungen bei unterschiedlichen Leistungsdichten (Leistungsdichtereihen) angepasst. Dabei wurden der Diffusionsterm und der Triplettterm von Gleichung 3.2-11 mittels individueller Anpassung der Parameter $I/N_{S,R}$, t_d , z_0/ω_0 , t_T , A_T an jede einzelne FCS-Kurve unabhängig vom Radikalkationsterm angepasst. Die Anpassung des Radikalkationsterms dagegen erfolgte global über alle FCS-Kurven

einer Leistungsdichtenreihe. (Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Anpassung über mehreren *FCS*-Kurven mit ausschließlich global angepasstem Radikalkationsterm als *Radikalkation-Targetfit*¹ bezeichnet.)

Die in der Besetzungswahrscheinlichkeit $S_{1eq(3z)}$ (Gleichung 3.2-18) enthaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Population und Depopulation der Triplett- und Singulettzustände wurden dabei konstant gehalten. Alle konstant gehaltenen Parameter sind in *Tabelle 3.2-14*, Seite 136 zusammengefasst. Die Austauschrate k_{diff} mit der die Fluorophore in bzw. aus dem konfokalen Volumen diffundieren wurde für die *FCS-Messungen* mit Hilfe der Relaxationszeit des Korrelationsterms der Diffusion (t_d) bestimmt. Aufgrund der beobachteten Abhängigkeit der t_d von der Leistungsdichte wurde der Mittelwert aus allen t_d einer Leistungsdichtereihe verwendet (vergl. Gleichung 3.2-37).

$$k_{diff} \approx \frac{1}{\langle t_D \rangle} \quad 3.2-37$$

Bei der Auswertung der Triplett-Parameter (Kapitel 3.2.4.2), wurden nur die Messungen bei niedrigen Leistungsdichten verwendet, da eine systematische Verschiebung der Geschwindigkeitskonstanten aufgrund der Effekten der Fluoreszenzsignalsättigung unvermeidlich gewesen wäre. Weil die Oxidation zum Radikalkation im Vergleich zur Besetzung des Triplettzustands sehr langsam verläuft ($k_{oxtot} \ll k_{ISC}$) und bei der Oxidation Mehrphotonen-Prozesse beteiligt sind, ist es nicht möglich die Eigenschaften des Radikalkations bei niedrigen Leistungsdichten mittels *FCS* zu bestimmen. Deswegen war es notwendig alle Messungen (auch bei hohen Leistungsdichten, mit durch die Sättigung stark verzerrten Detektionsvolumen) in die Auswertung einzubeziehen, was systematische Abweichungen insbesondere bei der Geschwindigkeitskonstante k_{oxn} nach sich ziehen kann (siehe dazu: Vergleich zwischen Geschwindigkeitskonstanten die aus *FCS* und Fluoreszenzsignal bestimmt wurden (Kapitel 3.2.5.3)).

Als erstes wurde eine Anpassung der *FCS*-Daten von *Rh 110* ohne Additive im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 10-900 \text{ kW/cm}^2$ durchgeführt. Die aus der

¹ Der *Radikalkation-Targetfit* wurde mittels eines Matlabscripts durchgeführt. Dieses Script wurde von Stanislav Kalinin in Zusammenarbeit mit Daniela Pfiffi entwickelt.

Anpassung mittels *Radikalkation-Targetfits* resultierenden Parameter des Radikalkations sind in Tabelle 3.2-8 und Abbildung 3.2-20 zusammengefasst. Die detaillierten Ergebnisse der Anpassung sind im Kapitel 5.5 zusammengetragen.

In der Analyse der *FCS*-Daten in Gegenwart von Additiven müssen zusätzlich die additivabhängigen Konstanten für die Oxidation bzw. Reduktion der angeregten Zustände berücksichtigt werden. Beim Additiv *AZB-C* müssen die thermodynamisch erlaubte Reduktion des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands mit der Geschwindigkeitskonstante k_{qRn^+} und darüber hinaus die Oxidation des S_I -Zustands mit der Geschwindigkeitskonstante k_{qoxSI} berücksichtigt werden. In den bereits publizierten Untersuchungen der Auswirkung des Additivs *AZB-C* auf *Rh 123* wurde zusätzlich die Reduktion des $R_I^{\bullet+}$ -Zustands durch *AZB-C* mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_{qR^+} = 0.02 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ beobachtet [24]. Weil die Reduktion des Radikalkations von *Rh 123* mittels *AZB-C* thermodynamisch verboten ist [24] wird diese Geschwindigkeitskonstante vermutlich aufgrund von Verunreinigungen des Additivs beobachtet. Die in diesem Kapitel präsentierten Daten wurden unter Verwendung des gleichen Additivs aufgenommen (CAS-Nummer 1562-93-2 bezogen von Sigma-Aldrich (479624Aldrich-98%)). Deswegen wird in der Analyse der *FCS*-Daten von *Rh 110* in Gegenwart von *AZB-C* auch die thermodynamisch verbotene Geschwindigkeitskonstante k_{qR^+} berücksichtigt.

Auch wenn grundsätzlich in jeder Messreihe starke Konzentrationsänderungen des Fluorophors beobachtet wurden (siehe dazu Kapitel 3.2.5.2 und Kapitel 5.6), die für Photozerstörung des *Rh 110* unter der verwendeten Messbedingungen sprechen, tendierten die Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung in allen Datensätzen gegen null, wenn sie als globale Fitparameter eingesetzt wurden. Folglich führte das Einsetzen der Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung als globale Fitparameter in keinem Fall zur Verbesserung des Anpassungsergebnisses. Dies spricht dafür, dass alle Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung deutlich kleiner waren im Vergleich zu den Geschwindigkeitskonstanten der anderen Prozesse, so dass die Photozerstörung für die beobachteten Fluktuationen des Fluoreszenzsignals im Detektionsvolumen vernachlässigbar ist. Die Änderung der Gesamtkonzentration der Fluorophore wurde im Rahmen der Auswertung nicht berücksichtigt, da für die Auswertung nur die auf die Gesamtamplitude

normierten Korrelationsamplituden verwendet wurden. Letztendlich wurden für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der übrigen Prozesse alle Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung auf 0 fixiert. Damit galt für die Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustands ST unter Gleichgewichtsbedingungen Gleichung 3.2-32.

Für die Anpassung der *FCS*-Kurven von *Rh 110* mit dem Additiv *AZB-C* mittels *Radikalkation-Targetfits* wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_{ox0} , k_{red0} , k_{oxn} , k_{qR^+} , k_{qoxSI} und k_{qRn^+} global über alle *FCS*-Kurven angepasst. Alle weiteren benötigten Parameter wurden fixiert (Tabelle 3.2-14, Seite 136). Die Anpassung wurde über drei Leistungsdichtereihen im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 10\text{-}900 \text{ kW/cm}^2$ mit *AZB-C* Konzentrationen von $[Q]_{AZB-C} = 250, 500, 800 \text{ }\mu\text{M}$ (entsprechend 16, 16, 14 *FCS*-Kurven) durchgeführt. Die aus der Anpassung mittels *Radikalkation-Targetfits* resultierenden Parameter des Radikalkations sind in Tabelle 3.2-8 und Abbildung 3.2-20 zusammengefasst. Die detaillierten Ergebnisse der Anpassung sind im Kapitel 5.5 zusammengetragen.

Diskussion der Ergebnisse der Auswertung mittels Radikalkation-Targetfits der FCS-Messungen von Rh 110 ohne Additive und in Gegenwart von AZB-C

Tabelle 3.2-8 Spezifische Konstanten von *Rh 110* und *AZB-C*, die durch globale Anpassung der Gleichung 3.2-11 an die *FCS*-Daten bestimmt wurden.

<i>ohne AZB-C</i>			
	$k_{red0} [10^3 \cdot s^{-1}]$	$k_{ox0} [10^3 \cdot s^{-1}]$	$k_{oxn} [cm^2 \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}]$
<i>Rh 110-spezifisch</i>	1.5	25 (27) ^c	0.06 (0.01) ^c
<i>Rh 123-spezifisch [24]</i>	1.5	16	0.04
<i>mit AZB-C spezifisch</i>			
	$k_{qR^+} [10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}]$	$k_{qRn^+} [cm^2 \cdot W^{-1} \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}]$	$k_{qoxSI} [10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}]^c$
<i>Rh 110-spezifisch</i>	0.003 ^a	19	0.004
<i>Rh 123-spezifisch [24]</i>	0.02 ^a	---- ^b	0.02

^aAufgrund der Oxidationspotentiale thermodynamisch verboten (Kapitel 3.2.3.5), ist wahrscheinlich auf Verunreinigungen des Additivs zurückzuführen.

^bwurde in der Analyse der Daten von *Rh 123* nicht berücksichtigt.

^cdiese Wert stammt aus der Auswertung der Fluoreszenzintensität (Kapitel 3.2.5.3)

Die mittels *Radikalkation-Targetfits* bestimmte Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation der Singulett- und Triplettzustände k_{ox0} und k_{oxn} setzen sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation aus den S_I - und T_I -Zustände k_{oxSI} , k_{oxTI} bzw. k_{oxSn} , k_{oxTn} zusammen (vergl. Gleichung 3.2-23 und Gleichung 3.2-24). Unter der Annahme, dass die Oxidation aus den Singulett- und Triplettzuständen gleich schnell ist [24, 63], können die Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation aus den Singulett- und Triplettzuständen mit Hilfe der Gleichung 3.2-38 bzw. der Gleichung 3.2-39 berechnet werden: $k_{oxSI} \approx k_{oxTI} \approx 5200 \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{oxSn} \approx k_{oxTn} \approx 0.013 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

$$k_{oxSI} = k_{oxT} = \frac{k_{ox0}}{1 + \frac{k_{ISC}}{k_{T0}}} \quad 3.2-38$$

$$k_{oxSn} = k_{oxTn} = \frac{k_{oxn}}{1 + \frac{k_{ISC}}{k_{T0}}} \quad 3.2-39$$

mit $k_{ox0} = 25000 \text{ s}^{-1}$, $k_{oxn} = 0.067 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Tabelle 3.2-8) sowie $k_{ISC} = 14 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$, $k_{T0} = 3.7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 3.2-7)

Die bereits publizierten Werte der Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation der S_I - und T_I -Zustände von *Rh 110* $k_{oxSI} = k_{oxTI} = 2100 \text{ s}^{-1}$ [63] als die Rahmen dieser Arbeit gemessenen Geschwindigkeitskonstanten¹. In der erwähnten Publikation wurde ein anderes kinetisches Modell ohne Austauschrate k_{diff} zur Beschreibung der elektronischen Zustände verwendet. Das Fehlen von k_{diff} führt zwangsläufig zu kleineren Werten von k_{ox0} , weil k_{diff} im Rahmen des kinetischen Modells (*Modell 1a*, Abbildung 3.2-14) zu einer Verringerung der Gleichgewichtskonzentration des

¹ Zusätzlich wird in der angeführten Referenz die Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation aus den höher angeregten Singulett- und Triplettzustände mit $k_{oxSn} = k_{oxTn} = 5.8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ angegeben, wobei für diese Konstante ein anderes Modell, beim die Besetzungswahrscheinlichkeiten der höher angeregten Zustände ausgerechnet werden, verwendet wird. Um diese Konstanten mit der mit der im Rahmend dieser Arbeit ermittelte Konstante k_{oxn} vergleichen zu können, werden die in der angeführten Referenz verwendeten Absorptionsquerschnitte der Zustände S_I und T_I des *Rh 110* benötigt. Leider wurde von den Autoren versäumt die bei deren Auswertung verwendeten Absorptionsquerschnitte anzugeben, was einen Vergleich mit der in dieser Arbeit bestimmten Werten unmöglich macht.

langlebigen Radikalkationenzustands im Anregungsvolumen führt (Gleichungen 3.2-13 bis 3.2-17).

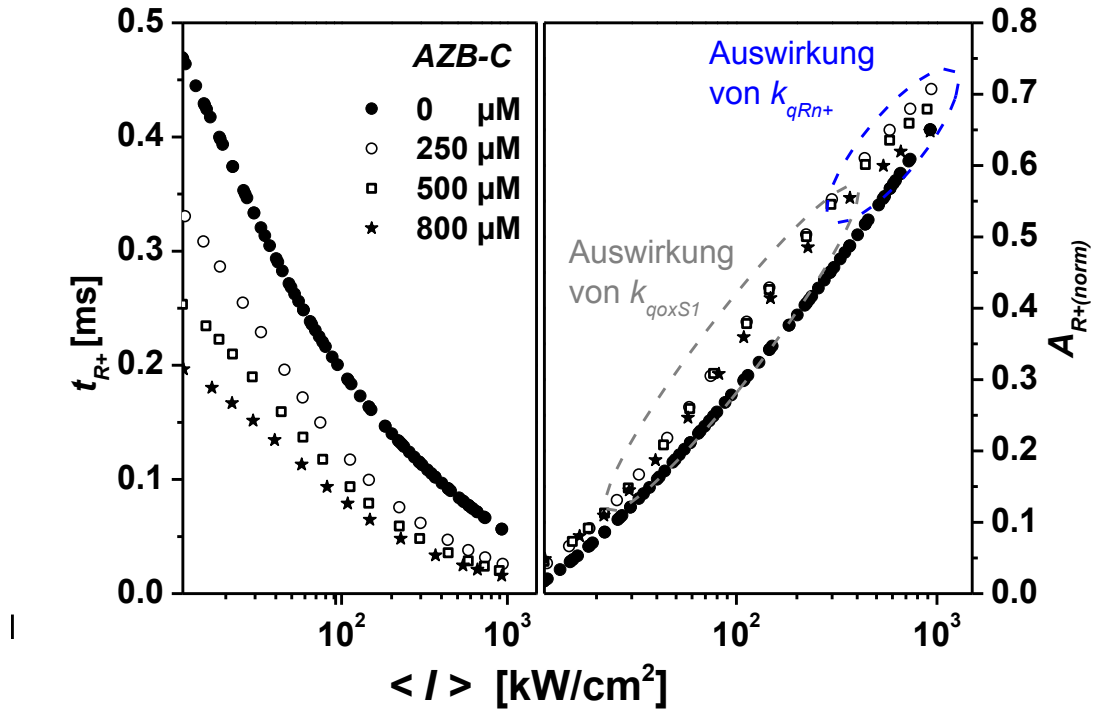


Abbildung 3.2-20 Aus dem *Target-Fit* resultierenden Amplituden $A_{R^+(norm)}$ und die Relaxationszeiten t_{R^+} des Radikalkationenzustands von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) mit und ohne des Additivs *AZB-C* in Abhängigkeit von der Leistungsdichte. In Gegenwart von *AZB-C* kann eine Erhöhung der Amplituden aufgrund der Oxidation des S_I -Zustands mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{qoxS1} = 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ beobachtet werden. Mit steigender Leistung führt die Reduktion des R_n^{++} -Zustands durch das Additiv mit einer von der Leistungsdichte abhängigen Geschwindigkeitskonstante $k_{qRn^+} = 19 \text{ W}^{-1} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ zu einer Absenkung der Amplituden des Radikalkationenzustands R^{++} .

Zusätzlich zur oben beschriebenen Anpassung der *FCS*-Daten von Messungen mit Additiv *AZB-C* wurden Anpassungen mit wahlweise auf 0 fixierten Geschwindigkeitskonstanten k_{qRn^+} und k_{qR^+} durchgeführt. Dabei konnte nur eine sehr gute Übereinstimmung bei den Geschwindigkeitskonstanten k_{ox0} , k_{red0} und k_{oxn} mit dem Datensatz ohne *AZB-C* beobachtet werden, wenn sowohl k_{qRn^+} als auch k_{qR^+} global angepasst wurden (Tabelle 3.2-9). Darüber hinaus wurde bei der Anpassung mit k_{qRn^+} und k_{qR^+} als globale Parameter das beste Anpassungsergebnis beobachtet (das kleinste gemittelte χ^2 siehe Tabelle 3.2-9). Damit konnte bei Messungen mit *Rh 110* ähnlich wie bei Messungen mit *Rh 123* [24] sowohl eine oxidierende als auch eine reduzierende Wirkung von *AZB-C*, die sich in kleineren Relaxationszeiten t_{R^+} und leicht erhöhten Amplitude $A_{R^+(norm)}$ des Radikalkationterms zeigt, beobachtet

werden. Die beobachtete Reduktion des höherangeregten R_n^{*+} -Zustands äußert sich durch das Abknicken der Radikal-Amplitude $A_{R+(norm)}$ bei hohen Anregungsleistungsdichten (Abbildung 3.2-20). Zu beachten ist, dass mit steigender Konzentration des Additivs die Auswirkung der Reduktion des höherangeregten R_n^{*+} -Zustands auf die Amplitude $A_{R+(norm)}$ zunimmt. Damit kann die Sättigung des Fluoreszenzsignals (Kapitel 2.4.2) als Ursache für das Abknicken der Amplitude $A_{R+(norm)}$ ausgeschlossen werden, weil sie mit der steigenden Konzentration des Additivs abnehmen muss.

Theoretisch kommt die Photozerstörung aus dem R_n^{*+} -Zustand auch als Ursache des Abknickens der Amplitude $A_{R+(norm)}$ bei höheren Leistungsdichten in Frage. Bei Anpassung der leistungsabhängigen Geschwindigkeitskonstante für die Photozerstörung des Radikalkations aus dem R_n^{*+} -Zustand k_{bRn^+} (Kapitel 3.2.4) anstatt der Geschwindigkeitskonstante k_{qRn^+} wurde ein sehr großes gemittelt χ^2 von $\chi^2 > 5$ beobachtet. Damit konnte die Photozerstörung als Ursache des Abknickens der Amplitude $A_{R+(norm)}$ ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.2-9 Ergebnisse der Anpassung des *Radikalkation-Targetfits* an *FCS*-Daten von *Rh 110* mit und ohne *AZB-C* (siehe Abbildung 3.2-20), mit wahlweise auf 0 fixiert Geschwindigkeitskonstanten k_{qRn^+} und k_{qR^+} .

	<i>Rh110+AZB-C</i>			<i>Rh110 ohne Additiv</i>
	k_{qR^+} und k_{qRn^+} werden verwendet	$k_{qRn^+} = 0$	$k_{qR^+} = 0$	-----
<i>Rh 110-spezifisch</i>				
$k_{red0} [10^3 \cdot s^{-1}]$	1.4	1.0	2.8	1.5
$k_{ox0} [10^3 \cdot s^{-1}]$	25	19	24	25
$k_{oxn} [cm^2 \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}]$	0.067	0.08	0.065	0.064
<i>AZB-C-spezifisch</i>				
$k_{qRn^+} [W^{-1} \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}]$	19	0	20	-----
$k_{qR^+} [10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}]$	0.003	0.013	0	-----
$k_{qoxSI} [10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}]$	0.004	0.001	0.008	-----
χ^2	2.29	3.35	2.36	1.51

Bestimmung der maximalen Relaxationsrate des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands

Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Reduktion des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands kann für die Abschätzung der Lebensdauer des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands verwendet werden. Bei einer diffusionskontrolliert verlaufenden Reaktion zwischen dem Zustand $R_n^{\bullet+}$ und dem Additiv und sehr schneller Geschwindigkeitskonstante $k_{RnI^{\bullet+}}$ kann die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{qRn^+} nach Gleichung 3.2-40 berechnet werden.

$$k_{qRn^+} = R_{neq}^{\bullet+} \cdot k_{qdiff} \quad 3.2-40$$

$R_{neq}^{\bullet+}$ = Besetzungswahrscheinlichkeit des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands im Gleichgewicht

k_{qdiff} = diffusionskontrollierte Stoßrate zwischen dem Fluorophor und dem Additiv

Die Besetzungswahrscheinlichkeit des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands unter den Bedingungen

$k_{RnI^{\bullet+}} \gg k_{RIn^{\bullet+}}$ und $k_{RnI^{\bullet+}} \gg k_{RIn^{\bullet+}} \gg k_{qRn^+}$ kann nach Gleichung 3.2-41 berechnet werden

$$R_{neq}^{\bullet+} \approx \frac{k_{RIn^{\bullet+}}}{k_{RnI^{\bullet+}}} \quad 3.2-41$$

Aus der Kombination von Gleichungen 3.2-40 und 3.2-41 ergibt sich ein Ausdruck für die Abhängigkeit der Relaxationszeit aus dem $R_n^{\bullet+}$ -Zustand $k_{RnI^{\bullet+}}$ von den Geschwindigkeitskonstanten k_{qRn^+} , $k_{RIn^{\bullet+}}$ und k_{qdiff} (Gleichung 3.2-42)

$$k_{RnI^{\bullet+}} \approx \frac{k_{RIn^{\bullet+}}}{k_{qRn^+}} \cdot k_{qdiff} \quad 3.2-42$$

Mit einer abgeschätzten maximalen Stoßrate zwischen dem Rhodamin und dem AZB-C von $k_{qdiff} \leq 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kapitel 5.9) und einer ebenfalls abgeschätzten Anregungsrate von $k_{RIn^{\bullet+}} \approx 750 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kapitel 3.2.3.3) beträgt die maximale Relaxationsrate des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands $k_{RnI^{\bullet+}} \approx 0.3 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$.

3.2.5 Fluoreszenzsignal bei Messungen mit einer konfokalen Messanordnung

3.2.5.1 Darstellung des Modells

Im diesen Kapitel wird das Fluoreszenzsignal (Detektorzählrate) bei Messungen von *Rh 110* ohne Additive ausgewertet.

$$F_{cpm}(FCS) = \frac{F}{N} \quad (\text{Gleichung 3.2-6})$$

N = Anzahl der Fluorophore

Mit Hilfe des Fluoreszenzsignals zusammen mit der Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen, die aus der Detektorzählrate und dem Untergrundsignal nach Gleichung 3.2-43 bzw. aus der Amplitude des Diffusionsterms der Fluoreszenzkorrelationsfunktion berechnet werden können (Kapitel 3.2.3.13), wurde das Fluoreszenzsignal eines Fluorophors (F_{cpm}) nach Gleichung 3.2-6 bestimmt.

$$F = \langle \text{Gesamtzählrate} \rangle - \langle \text{Untergrundsignal} \rangle \quad 3.2-43$$

Anschließend wurde F_{cpm} in Kombination mit dem bereits hergeleiteten (Gleichung 3.2-17) elektronischen Zustandsmodell (*Modell 1a*) dazu verwendet um die Geschwindigkeitskonstanten für die Population (k_{ox0} und k_{oxn}) des Radikalkationenzustands des *Rh 110* bestimmen.

Die Emission der Fluoreszenzphotonen erfolgt bei einem Fluorophor aus dem S_1 -Zustand, folglich kann das Fluoreszenzsignal eines Fluorophors bestimmt werden in dem die stationäre Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands mit der Geschwindigkeitskonstante für die Fluoreszenz multipliziert wird. Wird zusätzlich berücksichtigt, dass in einer tatsächlichen Fluoreszenzmessung nur ein Teil der emittierten Photonen detektiert wird, so kann das gesamte gemessene Fluoreszenzsignal eines Fluorophors nach Gleichung 3.2-44 berechnet werden. Die Anwendung der Additive sollte durch Löschung der „dunklen“ Zustände (Triplet- und Radikalzustände) zur Steigerung der Fluoreszenzzählrate führen. Die maximal mögliche Fluoreszenzzählrate wäre demnach erreicht wenn alle dunklen Zustände

gelöscht wären, was zur Folge hätte, dass für die Anregung und die Relaxation des Fluorophors ein 2-Zustände Modell (S_0 , S_1 Abbildung 1.1-2) gelten würde [24].

$$F_{cpm} = G_{detect} \cdot k_F \cdot S_{1eq} \quad 3.2-44$$

F_{cpm} = Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro Farbstoffmolekül und Sekunde

G_{detect} = Detektionseffizienz

k_F = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz

S_{1eq} = Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands unter den Gleichgewichtsbedingungen (Siehe Kapitel 3.2.4.1 Gleichung 3.2-17 Modell 1a)

Damit kann die maximal mögliche Fluoreszenzzählrate eines Fluorophors berechnet werden, wenn die Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands eines Fluorophors mit zwei elektronischen Zuständen in Gleichung 3.2-44 eingesetzt wird. Dabei ist zu beachten, dass die interne Konversion von den Additiven in erster Näherung nicht beeinflusst wird. Deswegen muss bei der Berechnung eines maximal möglichen Fluoreszenzsignals eines Fluorophors auch bei einem 2-Zustände Modell die Geschwindigkeitskonstante der internen Konversion k_{IC} mit berücksichtigt werden (Gleichung 3.2-45).

$$F_{cpm}(\max) \approx F_{cpm(2z)} = G_{detect} \cdot k_F \cdot S_{1eq(2z)} = G_{detect} \cdot k_F \cdot \left(\frac{k_{01}}{k_{01} + (k_F + k_{IC})} \right) \quad 3.2-45$$

k_{IC} = Geschwindigkeitskonstante der internen Konversion

k_F = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz

k_{01} = Geschwindigkeitskonstante der Anregung

$S_{1eq(2z)}$ = Besetzungswahrscheinlichkeit von S_1 für ein 2-Zustände Modell

3.2.5.2 Das gesamte Fluoreszenzsignal

Bei der Auswertung der Terme der Modellgleichung für FCS (Kapitel 3.2.4) spielte die relativ langsame Photozerstörung des Fluorophors keine Rolle, auch wenn die Photozerstörung die Absoluten Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen beeinflussen kann. Im Vergleich dazu ist für die Auswertung des Fluoreszenzsignals das am konfokalen Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) gemessen wurde die absolute Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen entscheidend. Aus diesem Grund darf die Photozerstörung bei der Auswertung des Fluoreszenzsignals nicht vernachlässigt werden, da sich auch bei langsamer Photozerstörung auf der Zeitskala einer Intensitätsmessung (Minuten) die irreversibel gebildeten Produkte der

Photozerstörung in der unmittelbaren Umgebung des Detektionsvolumens anreichern.

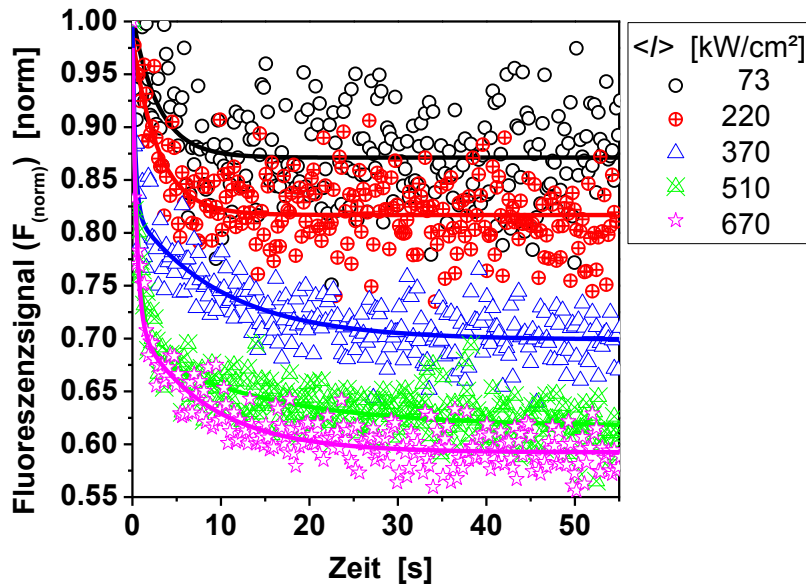


Abbildung 3.2-21 Abnahme der Fluoreszenz von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) nach Einschalten des Lasers bei Messungen am FCS-Fluoreszenzaufbau. Die Messungen wurden in einer Probenkammer (Thermo Scientific, Nunc Lab-Tek II, 155360) in einem Volumen von $V = 5 \text{ mL}$ durchgeführt. Die durchgezogenen Linien repräsentieren eine Anpassung der Gleichung 3.2-46. Es waren maximal zwei exponentielle Terme notwendig um die Daten anzupassen.

Diese Anreicherung der Photozerstörungsprodukte führt zwangsläufig zu einer niedrigeren Konzentration der anregbaren Fluorophore, was sich unmittelbar auf das Fluoreszenzsignal auswirkt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der Photozerstörung startet sofort nach dem Einschalten des Lasers (Abbildung 3.2-21), und dauert an bis sich ein Gleichgewicht aufgrund der Diffusion der Fluorophore aus dem Bereich außerhalb des Laserstrahls eingestellt hat (10-60 Sekunden). Bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FCS-Messungen wurde eine Probenkammer mit sehr kleinem Gesamtvolumen der Probe von $V = 10 \text{ }\mu\text{L}$ und sehr dünnen Flüssigkeitsschichten im Bereich von $h \approx 100 \text{ }\mu\text{m}$ (Kapitel 3.2.3.8) verwendet. In einer solchen Probenkammer ändert sich die Gesamtkonzentration der Fluorophore während einer Messreihe mit verschiedenen Leistungsdichten (Gesamtmessdauer eine Messreihe $t \approx 30\text{-}60 \text{ min}$) auch bei langsamer Photozerstörung. Zusätzlich findet aufgrund der dünnen Flüssigkeitsschichten zwischen den einzelnen Messpunkten einer Messreihe ($\Delta t \approx 1\text{-}5 \text{ min}$) keine adäquate Durchmischung der Probe statt.

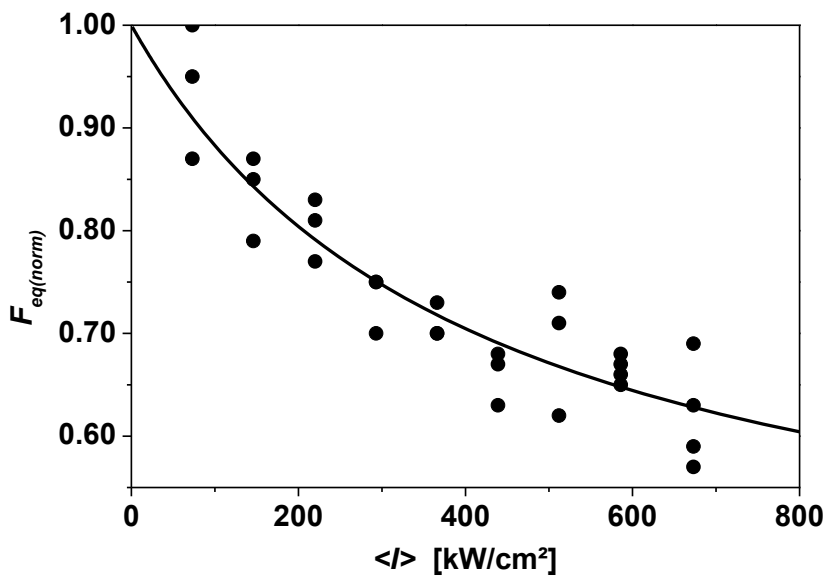


Abbildung 3.2-22 $F_{eq(norm)}$ Abhängigkeit von der mittleren Leistungsdichte. Die durchgezogene Linie repräsentiert eine Anpassung der Daten mit einer empirisch bestimmten Funktion (Gleichung 3.2-47).

Unter solchen Bedingungen ist es nicht möglich eine quantitative Auswertung des Fluoreszenzsignals durchzuführen. Deswegen wurde für diese Zwecke bei einer konfokalen Messanordnung eine zusätzliche Messreihe mit *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive in einer kommerziell erwerbbarer Probenkammer (*Thermo Scientific, Nunc Lab-Tek II, 155360*) mit möglichst großem Gesamtvolumen durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Probe betrug $V = 5$ mL. Um der lokalen Anreicherung der Photozerstörungsprodukte entgegenzuwirken wurde zusätzlich zwischen jeder einzelnen Messung der Messreihe die Lösung in der Probenkammer umgerührt. Das Fluoreszenzsignal wurde nach Erreichen des Gleichgewichtes zwischen der Photozerstörung und der Diffusion der Moleküle aus dem Bereich außerhalb des Laserstrahls aufgezeichnet (mehr als 60 Sekunden nach Einschalten des Lasers).

Das Fluoreszenzsignal F wurde nach Gleichung 3.2-43 bestimmt. Als die Untergrundzählrate wurde die separat gemessene Zählrate des Lösungsmittels verwendet. Das Ergebnis der Messung des stationären Fluoreszenzsignals F_{eq} bei verschiedenen mittleren Leistungsdichten ist in der Abbildung 3.2-23 zu finden.

Um den Einfluss der Photozerstörung auf F_{eq} zu berücksichtigen wurde zusätzlich die Abnahme des Fluoreszenzsignals unmittelbar nach Einschalten des Lasers gemessen

(Abbildung 3.2-21). Die zeitliche Abnahme des Fluoreszenzsignals konnte mit einem Ansatz aus zwei Exponentialtermen und einem konstanten Term (Gleichung 3.2-46) beschrieben werden.

$$F(t) = F_{eq} + A_1 \cdot e^{-t/t_1} + A_2 \cdot e^{-t/t_2} \quad 3.2-46$$

$F(t)$ = Zeit abhängiges Fluoreszenzsignal

F_{eq} = stationäres Fluoreszenzsignal im Gleichgewichtszustand

t_1, t_2 = Zeitkonstanten der Terme

A_1, A_2 = Amplituden der Terme

Der konstante Term (F_{eq}) entspricht hierbei dem stationären Fluoreszenzsignal. Das Verhältnis von F_{eq} zum Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt $t = 0$ entspricht der normierten Abnahme des Fluoreszenzsignals $F_{eq(norm)}$ aufgrund von Photozerstörung. Die Anpassung einer empirisch bestimmten Funktion (Gleichung 3.2-47)¹ an die gegen die mittlere Leistungsdichte aufgetragene $F_{eq(norm)}$ (Abbildung 3.2-22) liefert die Abhängigkeit der normierten Abnahme des Fluoreszenzsignals von der mittleren Leistungsdichte (Gleichung 3.2-48).

$$F_{eq(norm)}(<I>) \approx \frac{1 - F_{eq(norm)}(end)}{1 + <I> \cdot k} + F_{eq(norm)}(end) \quad 3.2-47$$

$$F_{eq(norm)}(<I>) \approx \frac{1 - 0.4}{1 + <I> \cdot 0.0024} + 0.4 \quad 3.2-48$$

(mit $<I>$ in kW/cm^2)

Mit der empirisch bestimmten Abhängigkeit der Fluoreszenzsignalabnahme von der Leistungsdichte ist es möglich den Einfluss von langsamer Photozerstörung auf die Fluoreszenzzählrate bei Messungen am konfokalen Aufbau zu berücksichtigen (Gleichung 3.2-49).

¹ Gleichung 3.2-47 stellt eine Funktion dar, die bei der Leistungsdichte von $<I> = 0$ den Wert von $F_{eq(norm)}(0) = 1$ annimmt, bei der gegen unendlich gehender Leistungsdichte nähert sich die Funktion einem Wert $F_{eq(norm)}(end)$ asymptotisch an (Abbildung 3.2-22).

$$F_{\text{korr}}(<I>) = \frac{F_{\text{eq}}(<I>)}{F_{\text{eq(nom)}}(<I>)} \quad 3.2-49$$

F_{korr} = Korrigiertes Fluoreszenzsignal

Das korrigierte Fluoreszenzsignal F_{korr} zusammen mit dem direkt gemessenen Fluoreszenzsignal F_{eq} aufgetragen in Abhängigkeit von der mittleren Leistungsdichte ist in Abbildung 3.2-23 zu finden

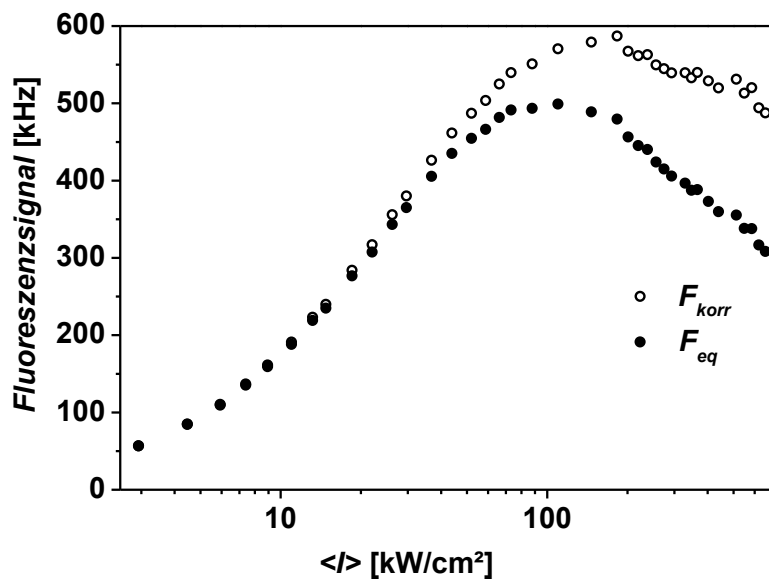


Abbildung 3.2-23 Das am FCS-Fluoreszenzaufbau gemessene stationäre Fluoreszenzsignal F_{eq} (gefüllte Symbole) zusammen mit dem mittels Gleichung 3.2-49 korrigierten Fluoreszenzsignal F_{korr} (leere Symbole) von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7).

3.2.5.3 Die Fluoreszenzzählrate pro Molekül

Die Fluoreszenzzählrate pro Fluorophor $F_{\text{cpm}}(\text{FCS})$ kann direkt mit Hilfe der Fluoreszenzzählrate F_{eq} und der Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen (N) bestimmt werden (Kapitel 3.2.3.13, Gleichung 3.2-6).

$$F_{\text{cpm}}(\text{FCS}) = \frac{F_{\text{eq}}}{N} \quad (\text{Gleichung 3.2-6})$$

Für die Anpassung der FCS-Daten, die bei Messungen von *Rh 110* ohne Additive aufgenommen wurden, wurde Gleichung 3.2-11 (Kapitel 3.2.4.3) verwendet. Die mittlere Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen N bei der Verwendung dieser

Modellgleichung kann mittels Gleichung 3.2-50 direkt aus der Amplitude des Diffusionsterms (A_{diff}) berechnet werden.

$$N = \frac{1}{A_{diff}} = \frac{N_{S,R}}{1 - T_1} \quad 3.2-50$$

Die gegen die Leistungsdichte aufgetragene $F_{cpm}(FCS)$ ist in Abbildung 3.2-25 abgebildet. Die entsprechende Fluoreszenzzählrate pro Molekül kann auch mit Hilfe von Gleichung 3.2-44 berechnet werden, wobei hierfür notwendige Besetzungswahrscheinlichkeit S_{1eq} nach Gleichung 3.2-17 (*Modell 1a*, vergl. Kapitel 3.2.4.1) mit bereits bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Population und die Depopulation der elektronischen Zustände (Abbildung 3.2-25 vergl. Kapitel 3.2.4.2, und Kapitel 3.2.4.3) berechnet wird. Die zusätzlich für Gleichung 3.2-44 notwendige Detektionseffizienz G_{detect} kann bei niedrigen Leistungsdichten direkt aus dem Fluoreszenzsignal bestimmt werden, und beträgt hier $G_{detect} = 0.022$ (siehe Kapitel 3.2.3.11). Die berechnete Fluoreszenzzählrate pro Molekül $F_{cpm}(berechnet)$ zeigt einen stark abweichenden Verlauf im Vergleich zu der $F_{cpm}(FCS)$ (vergl. Abbildung 3.2-25 gefüllte Punkte vs. gestrichelte schwarze Linie). Der Grund dafür ist die Verzerrung der Form des Anregungsprofils im Detektionsvolumen aufgrund der Sättigung des Fluoreszenzsignals (vergl. Kapitel 2.4.2 [47]). In einem dreidimensionalen gaußförmigen Detektionsprofil (Kapitel 2.4.1) wird mit steigender mittlerer Leistungsdichte eine konstante Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen erwartet. Tatsächlich wird eine mit der Leistungsdichte kontinuierlich ansteigende Anzahl der Fluorophore N beobachtet (Abbildung 3.2-24 B). Um die Sättigungseffekte bei der Bestimmung der mittleren Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen zu berücksichtigen, wurde die inverse Diffusionsamplitude der *FCS*-Modellgleichung Gleichung 3.2-11 mittels des *Radikalkation-Targetfits* (Kapitel 3.2.4.3) nach Gleichung 3.2-50 ermittelt und gegen die mittlere Leistungsdichte aufgetragen (Abbildung 3.2-24).

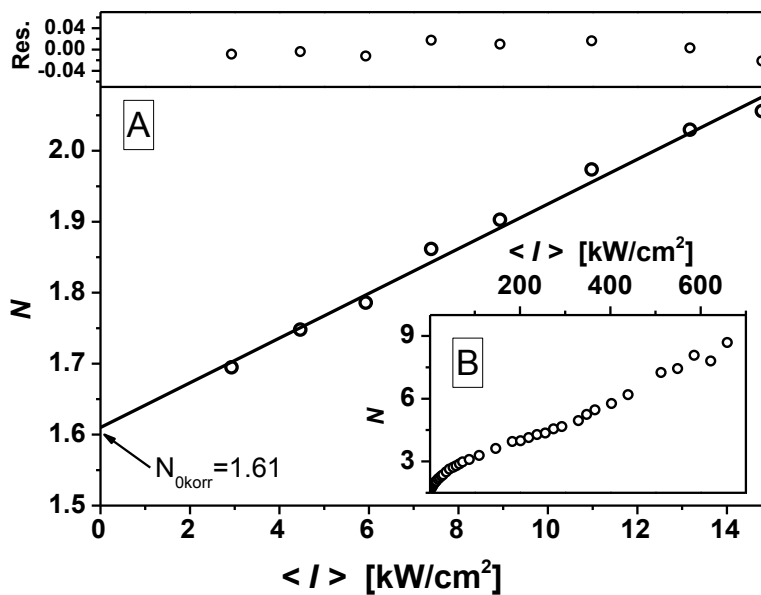


Abbildung 3.2-24 Aus den FCS-Messungen mittels Gleichung 3.2-50 ermittelte Anzahl der Fluorophore N im konfokalen Volumen. Im Teilbereich A ist N bei niedrigen Leistungsdichten abgebildet, im Teilbereich B ist N im gesamten Messbereich abgebildet. Die durchgezogene Linie repräsentiert eine lineare Anpassung an N im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 3\text{--}14.5$ kW/cm². Der y-Achsenabschnitt der linearen Anpassung ($N_{0korr} = 1.61$) repräsentiert die mittlere Anzahl der Fluorophore im konfokalen Volumen ohne Sättigungseffekte.

Die Extrapolation von N auf die mittlere Leistungsdichte von $\langle I \rangle = 0$ (y-Achsenabschnitt einer linearen Anpassung an N bei niedrigen Leistungsdichten (Abbildung 3.2-24)) entspricht einer mittleren Anzahl der Moleküle $N_{0korr} \approx 1.6$ im konfokalen Volumen ohne Sättigungseffekte. Die im Kapitel 3.2.5.1 beschriebene um die Photozerstörung korrigierte Fluoreszenzintensität F_{korr} und um Sättigungseffekte korrigierte Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen N_{0korr} können eingesetzt werden, um eine genauere Fluoreszenzzählrate pro Molekül $F_{cpm}(FCS, korr)$ in Abhängigkeit von der mittleren Leistungsdichte zu bestimmen (Gleichung 3.2-51). Um die Fluoreszenzzählrate quantitativ zu beschreiben, muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass bei höheren Leistungsdichten Fluorophore bereits außerhalb des Anregungsvolumens angeregt werden können. Der Übergang der angeregten Fluorophore in den langlebigen Radikalkationenzustand außerhalb des Detektionsvolumens führt zu einer zusätzlichen Verringerung der Gleichgewichtskonzentration der Moleküle im Singulettzustand im Detektionsvolumen, was eine zusätzliche von der Leistungsdichte abhängige Verringerung des Fluoreszenzsignals zur Folge hat (vergl. Kapitel 2.4.2).

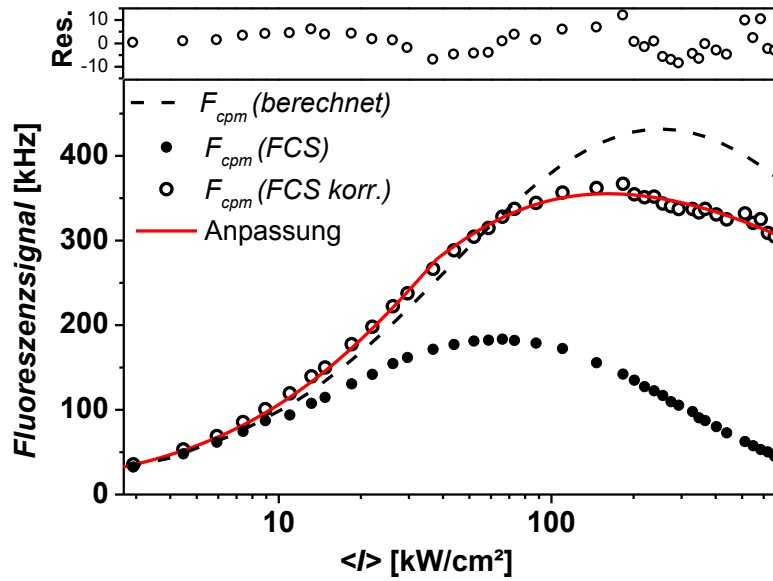


Abbildung 3.2-25 Gegen die Leistungsdichte aufgetragene Fluoreszenzzählrate. Die gefüllten Punkte repräsentieren die Fluoreszenzzählraten pro Fluorophor $F_{cpm}(FCS)^1$. Die hierfür benötigte Anzahl der Moleküle (N) wurde mit Hilfe der Diffusionsamplitude bestimmt ohne die Sättigungseffekte zu berücksichtigen (Gleichung 3.2-50 nähere Erklärungen siehe Text). Die gestrichelte schwarze Linie repräsentiert die mit Hilfe von Gleichung 3.2-44 berechnete Fluoreszenzzählrate pro Fluorophor. Die für Gleichung 3.2-44 notwendige Besetzungswahrscheinlichkeit S_{leq} wurde nach Gleichung 3.2-17 (Modell 1a) mit den mittels Auswertung des Korrelationsterms des Radikalkations bestimmten Geschwindigkeitskonstanten $k_{red0} = 1500 \text{ s}^{-1}$, $k_{oxS} = k_{oxT} = 5200 \text{ s}^{-1}$, $k_{oxnS} = k_{oxnT} = 0.013 \text{ s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2$, (vergl. Kapitel 3.2.4.3 Tabelle 3.2-8) berechnet. Die Austauschrate wurde nach Gleichung 3.2-37 berechnet ($k_{diff} = 7700 \text{ s}^{-1}$ vergl. Kapitel 5.5). Die Detektionseffizienz wurde auf $G_{detect} = 0.022$ fixiert (siehe Anhang Kapitel 3.2.3.11). Die restlichen benötigten Geschwindigkeitskonstanten siehe Tabelle 3.2-14 (Seite 136). Die leeren Punkte repräsentieren die mit Hilfe der um die Sättigungseffekte korrigierte Anzahl der Moleküle im Detektionsvolumen (N_{0korr}) und der gesamten Fluoreszenzintensität F_{korr} (Kapitel 3.2.5.2) berechneten Fluoreszenzzählraten pro Fluorophor $F_{cpm}(FCS, korr)$ (Gleichung 3.2-51). Die rote durchgezogene Linie repräsentiert eine Anpassung der Gleichung 3.2-44 an $F_{cpm}(FCS, korr)$ (nähere Erklärungen siehe Text).

$$F_{cpm}(FCS, korr) = \frac{F_{korr}}{N_{0korr}} \quad 3.2-51$$

Der Effekt der Anregung des Radikalkationzustands außerhalb des Anregungsvolumens auf das Fluoreszenzsignal kann berücksichtigt werden, indem die Austauschrate k_{diff} als leistungsabhängig angenommen wird. Unter den Annahmen, dass der Austausch der Fluorophore hauptsächlich aufgrund der

¹ Die Anpassung von Gleichung 3.2-44 an $F_{cpm}(FCS)$ ergab unrealistische Werte für die angepassten Parameter und wird deswegen hier nicht gezeigt.

Diffusion in der x-y-Ebene stattfindet ($\omega_0 \ll z_0$, siehe Kapitel 2.4.1), ein gaußförmiges Leistungsdichteprofil in der x-y-Ebene des Anregungsvolumens und ein konstanter Leistungsdichte-Schwellwert (I_S) vorliegen, ab dem der Übergang des Fluorophors in den Radikalkationenzustand außerhalb des Anregungsvolumens nicht mehr vernachlässigbar ist, kann die leistungsdichteabhängige Austauschrate nach Gleichung 3.2-52 berechnet werden (Herleitung siehe Kapitel 5.2).

$$k_{diff}(I) = \begin{cases} \left(\frac{8 \cdot D_F}{\ln\left(\frac{I_0}{I_S}\right) \cdot \omega_{0(a)}^2} \right) ; \{I_S < I_0\} \\ k_{diff_max} ; \{I_S \geq I_0\} \end{cases} \quad 3.2-52$$

D_F = Diffusionskoeffizient des Fluorophors ($D_{Rh110} = 4.4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$)

I_0 = Leistungsdichte im Fokuspunkt

$\omega_{0(a)}$ = Radius des Anregungsvolumens in der x-y Ebene, innerhalb dessen die Leistungsdichte auf $1/e^2$ abgefallen ist ($\omega_{0(a)} = 0.77 \text{ } \mu\text{m}$, Kapitel 2.4.1)

k_{diff_max} = maximale Austauschrate für den Fall, dass der Fluorophor nur im Detektionsvolumen angeregt werden kann.

Das Einsetzen der leistungsdichteabhängigen Austauschrate $k_{diff}(I)$ in Gleichung 3.2-17 (bei der Berechnung der Besetzungswahrscheinlichkeit S_{leq}) und die anschließende Anpassung von Gleichung 3.2-44 an $F_{cpm}(FCS, korr)$ im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 3-700 \text{ kW/cm}^2$ (Abbildung 3.2-25) mit global angepasstem Leistungsdichte-Schwellwert (I_S), maximaler Austauschrate k_{diff_max} , Geschwindigkeitskonstanten $k_{oxSl} = k_{oxTl}$ und $k_{oxSn} = k_{oxTn}$, und mit zusätzlich auf $G_{detect} = 0.022$ fixierter Detektionseffizienz und einer auf den Wert von $k_{red0} = 1500 \text{ s}^{-1}$ fixierten¹ Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion des Radikalkations ergibt die in Tabelle 3.2-10 zusammengetragene Konstanten (Übersicht aller fixierten Konstanten ist in Tabelle 3.2-14 (Seite 136) zu finden).

¹ Bei der Auswertung der Fluoreszenzzählrate ist zu beachten, dass die Geschwindigkeitskonstanten für die Population und Depopulation des Radikalkationenzustands als Verhältnisse von einander in das Modell eingehen, deswegen müsste der Wert der Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion des Radikalkations auf den bei der Auswertung des Korrelationsterms des Radikalkations bestimmten Wert fixiert werden.

Diskussion der Ergebnisse der Auswertung der Fluoreszenzzählrate

Der bei der Anpassung verwendete Parameter k_{diff_max} entspricht der Austauschrate bei sehr niedrigen Leistungsdichten unter der Voraussetzung, dass die Fluorophore hauptsächlich nur im Detektionsvolumen angeregt werden können. k_{diff_max} kann unabhängig von der Auswertung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe von *FCS*-Messungen direkt bestimmt werden. Damit kann die Richtigkeit der gemachten Korrekturen des Fluoreszenzsignals überprüft werden.

Tabelle 3.2-10 Spezifische Konstanten des *Rh 110*, die durch die globale Anpassung von Gleichung 3.2-44 an das Fluoreszenzsignal eines Fluorophors berechnet wurden.

In Klammern sind die Standardfehler σ_n der Anpassung für den jeweiligen Parameter angegeben.

$k_{oxSl} = k_{oxTl} [10^3 \cdot s^{-1}]$	$5.6(\pm 0.2)$
$k_{oxSn} = k_{oxTn} [cm^2 \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}]$	$0.002(\pm 0.0003)$
$I_S [kW \cdot cm^{-2}]$	$22(\pm 2)$
$k_{diff_max} [10^3 \cdot s^{-1}]$	$8.0(\pm 0.9)$

Unter der Annahme, dass das für *FCS*-Messungen definierte Detektionsvolumen (Kapitel 2.4.1) auch dem Detektionsvolumen bei der Auswertung des Fluoreszenzsignals entspricht, kann die Relaxationszeit des Diffusionsterms der *FCS*-Modellgleichung (Gleichung 3.2-11) verwendet werden um k_{diff} zu berechnen. Dabei entspricht k_{diff} der inversen Relaxationszeit des Diffusionsterms ($k_{diff} = 1/t_d$ Gleichung 3.2-37) der *FCS*-Modellgleichung (Gleichung 3.2-11). Hierbei ist zu beachten, dass die Fluoreszenzsignalsättigung t_d stark verfälschen kann (vergl. Kapitel 2.4.2). Um k_{diff_max} mittels *FCS* unter Berücksichtigung der Sättigungseffekte zu bestimmen, wurden die inversen Diffusionszeiten der *FCS*-Modellgleichung mittels des *Radikalkation-Targetfits* (Kapitel 3.2.4.3) ermittelt und gegen die mittlere Leistungsdichte aufgetragen (Abbildung 3.2-26). Die Extrapolation von k_{diff} auf die mittlere Leistungsdichte von $\langle I \rangle = 0$ (y-Achsenabschnitt einer linearen Anpassung an k_{diff} bei niedrigen Leistungsdichten (Abbildung 3.2-26 A)) entspricht k_{diff_max} . Der Wert der mittels *FCS* ermittelten Austauschrate betrug $k_{diff_max} = 7600 s^{-1}$, was im Rahmen der Fehlergrenzen dem mittels Fluoreszenzsignal ermittelten Wert ($k_{diff_max} = 8100 s^{-1}$) entspricht. Die Übereinstimmung der beiden Werte, bestätigt das Modell mit fester Leistungsdichte-Schwelle I_S und die Annahme des vorwiegend in

der x-y Ebene stattfindenden Austausches der Fluorophore im Detektionsvolumen (Kapitel 3.2.5.3 siehe auch Kapitel 5.2).

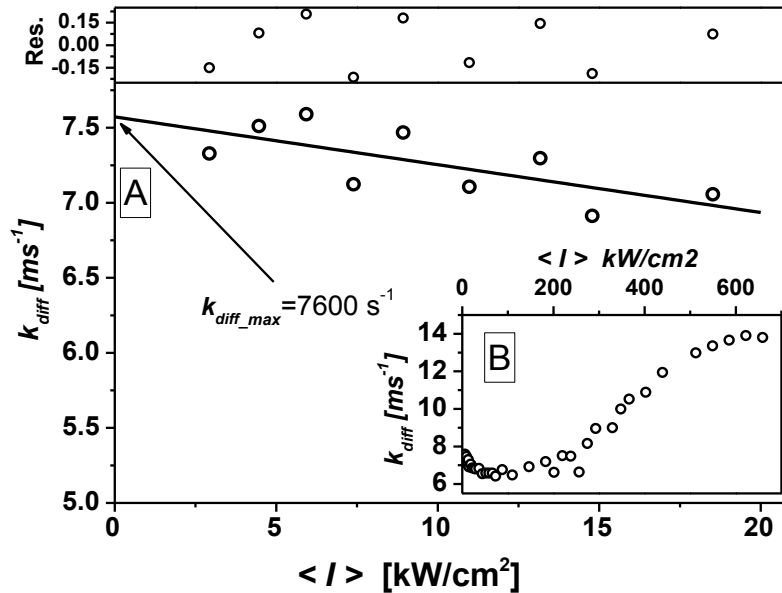


Abbildung 3.2-26 Aus den FCS-Messungen ermittelte Austauschrate k_{diff} aufgetragen gegen mittlere Leistungsdichte. Im Teilbereich A ist k_{diff} bei niedrigen Leistungsdichten, im Teilbereich B im gesamten Messbereich abgebildet. Die durchgezogene Linie repräsentiert eine lineare Anpassung an k_{diff} im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 3-18 kW/cm^2$. Der y-Achsenabschnitt der linearen Anpassung ($k_{diff_max} = 7600 s^{-1}$) repräsentiert die Austauschrate ohne der Auswirkung der Anregung des Fluorophors außerhalb des Detektionsvolumens und ohne Sättigungseffekte (Kapitel 2.4.2).

Der Leistungsdichte-Schwellwert (I_S), ab dem der Übergang der Fluorophore in den Radikalkationenzustand außerhalb des Anregungsvolumens nicht mehr vernachlässigbar ist, wurde mit $I_S = 22 kW \cdot cm^{-2}$ bestimmt. I_S bezieht sich auf die maximale Leistungsdichte im Fokuspunkt I_0 (vergl. Kapitel 5.2). Bezogen auf die mittlere Leistungsdichte $\langle I \rangle = 0.8 \cdot I_0$ (vergl. Kapitel 2.4.1) bedeutet dieser Schwellwert, dass ab einer mittleren Leistungsdichte im Detektionsvolumen von $\langle I \rangle = 16.5 kW \cdot cm^{-2}$ die Anregung der Fluorophore in den Radikalkationenzustand außerhalb des Anregungsvolumens zu einer nicht vernachlässigbaren Abweichung der Fluoreszenzzählrate führen wird.

Die aus dem Fluoreszenzsignal ermittelte Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation der ersten angeregten Singulett- und Triplettzustände $k_{oxSI} = k_{oxTI} = 5600 s^{-1}$ stimmt gut mit der mittels *Radikalkation-Targetfit* ermittelten gleichen Geschwindigkeitskonstante ($k_{oxSI} = k_{oxTI} = 5200 s^{-1}$ vergl. Kapitel 3.2.4.3) überein. Die aus dem Fluoreszenzsignal ermittelte Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation der höheren angeregten Singulett- und Triplettzustände

$k_{oxSn} = k_{oxTn} = 0.002) \text{ s}^{-1}$ dagegen weicht um das 6.5-fache von der mittels *Radikal-kation-Targetfit* ermittelten gleichen Geschwindigkeitskonstante ($k_{oxSn} = k_{oxTn} = 0.013 \text{ s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ Kapitel 3.2.4.3) ab. Der wahrscheinlichste Grund dafür ist die durch Fluoreszenzsignalsättigung bedingte (Kapitel 2.4.2) systematische Abweichung der aus der Korrelationsamplitude bestimmten Geschwindigkeitskonstanten. Dabei wirkt sich die Fluoreszenzsignalsättigung auf die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation der höheren angeregten Singulett- und Triplettzustände besonders stark aus, da diese nur im Bereich mit stark verzerrtem Detektionsvolumen (bei hohen Leistungsdichten) bestimmt werden.

Im Vergleich zu der Auswertung des Korrelationsterms wurden bei der Auswertung der Fluoreszenzzählrate umfangreiche Korrekturen, die zusätzliche Effekte von hohen Leistungsdichten berücksichtigen verwendet, deswegen wird für den weiteren Verlauf der Auswertungen nur die aus der Fluoreszenzzählrate bestimmte Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation der höheren angeregten Singulett- und Triplettzustände verwendet.

3.2.6 Auswertung der FCS-Messungen von Rh110 in Gegenwart von Trolox

3.2.6.1 Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der elektronischen Zustände von Rh 110 unter Berücksichtigung von Radikalanionzuständen

Im Gegensatz zu FCS-Messungen ohne Additive oder mit dem Additiv AZB-C, bei denen die Relaxationszeit des Radikalterms und die Relaxationszeit des Diffusionsterms nah beieinander lagen, wurden bei FCS-Messungen mit dem Additiv Trolox nah beieinander liegende Relaxationszeiten der Radikal- und Tripletterme beobachtet.

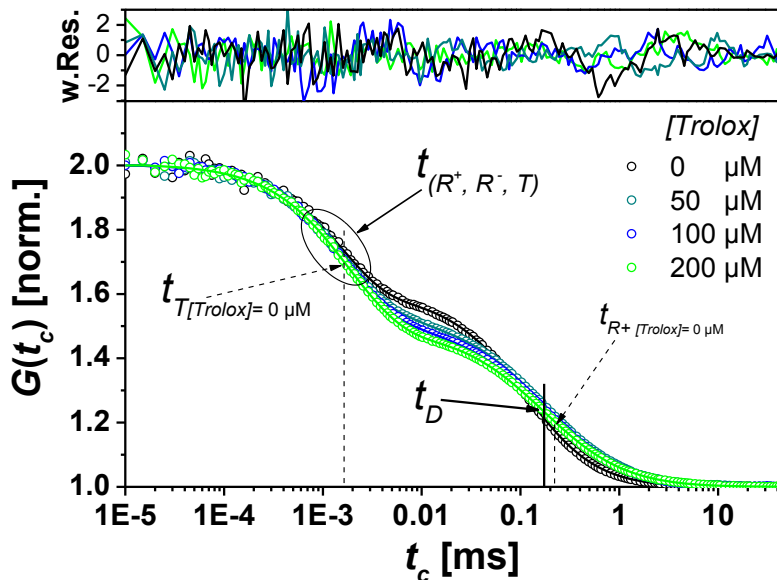


Abbildung 3.2-27 FCS-Daten (Punkte) von Rh 110 in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive und in Gegenwart des Additivs Trolox bei einer Leistungsdichte von $\langle I \rangle \approx 100 \pm 10 \text{ kW/cm}^2$. Bei der FCS-Messung ohne Trolox repräsentiert die durchgezogene Linie eine Anpassung der Gleichung 3.2-11 an die FCS-Kurve. Bei Messungen in Gegenwart von Trolox repräsentieren die durchgezogenen Linien eine Anpassung der Gleichung 3.2-62 an die FCS-Kurven (siehe Text unten).

Weiterhin sind in Gegenwart von Trolox sowohl die Oxidation als auch die Reduktion des S_1 -Zustands thermodynamisch erlaubt. Deswegen müssen der Radikalkation-, der Radikalanion- und der Tripletzustand bei der Auswertung von FCS-Messungen mit Trolox berücksichtigt werden. Bei einer zusätzlichen Zugabe des Additivs AZB-C ($[Q]_{\text{AZB-C}} = 500$ bzw. $800 \mu\text{M}$) zur einer Rh 110 Lösung, die bereits das Additiv Trolox ($[Q]_{\text{Trolox}} = 100$ bzw. $200 \mu\text{M}$) enthält, wurde eine Verschiebung des Tripletterms in die Richtung kürzerer Relaxationszeiten

beobachtet (Abbildung 3.2-28). Die Relaxationszeiten aller Dunkelzustände (T , R_I^{*+} , R_I^{*-}) in Gegenwart von *Trolox* wurden in Bereich von $t_{(R^+, R^+, T)} \approx 5\text{-}0.5\ \mu\text{s}$ beobachtet (Abbildung 3.2-27 und Abbildung 3.2-28).

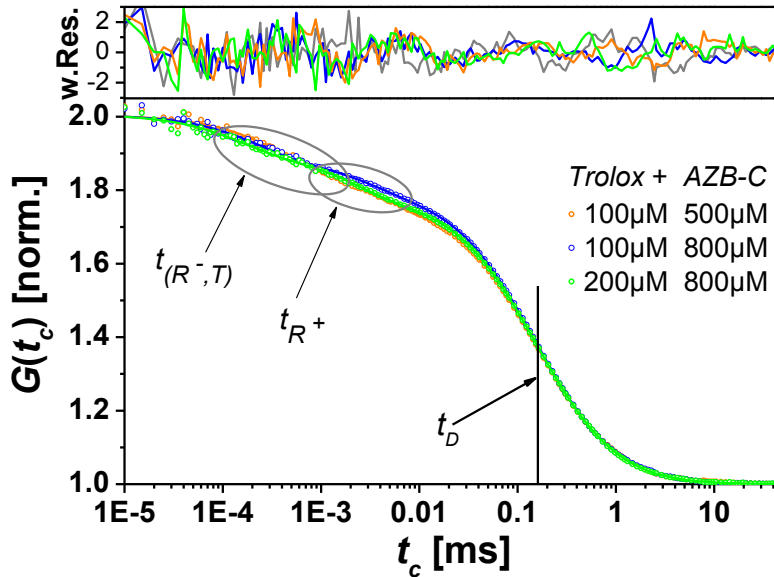


Abbildung 3.2-28 FCS-Daten (leere Punkte) von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart der Additive *Trolox* und *AZB-C* bei einer Leistungsdichte von $\langle I \rangle \approx 100 \pm 10\ \text{kW/cm}^2$. Die durchgezogenen Linien repräsentieren eine Anpassung der Gleichung 3.2-73 an die FCS-Kurven (siehe Text).

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FCS-Messungen mit *Trolox* wurde eine Überlappung des Radikalanionterms mit dem Triplettterm oder dem Radikalkationterm beobachtet. Dies macht eine Herleitung der Besetzungswahrscheinlichkeiten der elektronischen Zustände von *Rh 110* unter der Berücksichtigung der Besetzungswahrscheinlichkeiten der Triplett-, Radikalanion- und Radikalkationzuständen für die Auswertung von FCS-Messungen mit *Trolox* notwendig. Die Herleitung eines solchen Modells erfolgt im nächsten Kapitel (siehe auch Kapitel 5.1.3). Das hergeleitete Modell wird anschließend für die Auswertung der Amplituden der Korrelationsterme von *Rh 110* in Gegenwart von *Trolox* verwendet (Kapitel 3.2.6.2).

Das im Kapitel 3.2.2 bereits präsentierte elektronische Zustandsmodell mit Radikalanion- und Radikalkationzuständen (Abbildung 3.2-1) ist zu komplex für eine praktikable Beschreibung der beobachteten Amplituden von Korrelationstermen der Dunkelzustände des *Rh 110* in Gegenwart von *Trolox*. Deswegen wird hier ein vereinfachtes elektronisches Zustandsmodell mit Singulett-, Triplett- und beiden

Radikalzuständen unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse für *FCS*-Messungen in Gegenwart von *Trolox* (*Modell 3a*) abgeleitet.

Die Lebensdauern der höher angeregten Triplett-, Radikalkation- und Radikalanion-Zustände betragen $\tau_{Rn^+} \approx 4$ ps (Kapitel 3.2.4.3), $\tau_{Rn^+} \tau_{Tn} \approx \tau_{Sn} \approx 0.2$ ps [65]. Damit spielen diese Zustände eine vernachlässigbare Rolle für die Besetzungswahrscheinlichkeit der energetisch direkt darunterliegenden elektronischen Zustände und für die additivabhängigen Elektronentransferreaktionen. Im Gegensatz dazu ist die Lebensdauer des höher angeregten Radikalanionzustands ($R_n^{\bullet-}$) nicht bekannt. Deswegen können die additivabhängigen Konstanten für die Oxidation des angeregten $R_n^{\bullet-}$ -Zustands nicht vernachlässigt werden. In diesem Zusammenhang kann das kinetische Modell mit Radikalanion- und Radikalkationzuständen für die Anregung und Relaxation eines Rhodamins (Abbildung 3.2-1) in Gegenwart von *Trolox* vereinfacht werden, indem die höher angeregten Zustände ($R_n^{\bullet+}, T_n, S_n$) mit energetisch direkt darunterliegenden Zuständen ($R_l^{\bullet+}, T_l, S_l$) zu einem entsprechenden elektronischen Zustand ($R^{\bullet+}, T, S$) zusammengefasst werden. Bei der maximal eingesetzten Leistungsdichte von $\langle I \rangle_{max} \approx 10^6$ kW/cm² und der sehr großen Relaxationsrate der höher angeregten $R_n^{\bullet+}$ -, T_n - und S_n -Zustände kann für die Besetzung der Radikalkation- Singulett- und Triplettzustände $S_{eq} \approx S_{leq}$, $T_{eq} \approx T_{leq}$ und $R_{eq}^{\bullet+} \approx R_{leq}^{\bullet+}$ angenommen werden. Bei Auswertung der *FCS*-Messungen von *Rh 110* ohne Additive konnte kein Einfluss der Photozerstörung auf den Radikalkationzustand beobachtet werden, obwohl der Radikalkationzustand bei *Rh 110* unter diesen Bedingungen die längste Lebensdauer aufweist. Damit kann angenommen werden, dass die Photozerstörung bei allen anderen *FCS*-Messungen eine vernachlässigbare Rolle spielen wird, da alle elektronischen Zustände deutlich kürzere Lebensdauern im Vergleich zur Lebensdauer des Radikalkationzustands von *Rh 110* ohne Additive haben.

Die schematische vereinfachte Darstellung eines solchen kinetischen Modells mit insgesamt sechs elektronischen Zuständen ohne Photozerstörung ist in der Abbildung 3.2-29 (*Modell 3a*) zu finden (die detaillierte Darstellung des Modells ist in Abbildung 5.1-1 (Anhang, Kapitel 5.1.3) zu finden).

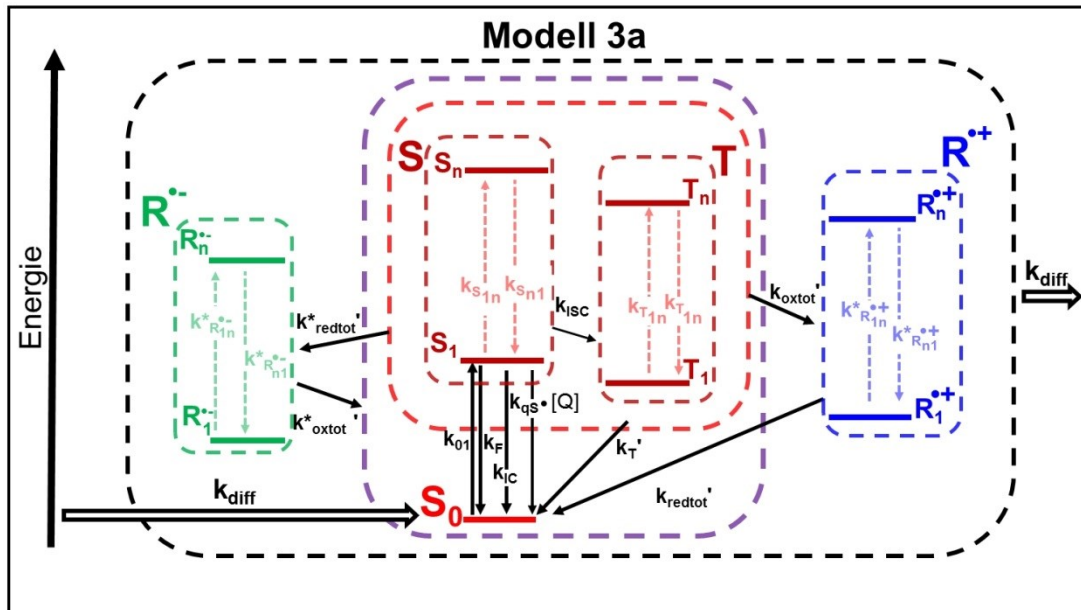


Abbildung 3.2-29: Kinetisches Modell eines Fluorophors mit Singulett-, Triplett-, Radikalanion- und Radikalkationzuständen und der Austauschrate k_{diff} , mit der die Fluorophore in bzw. aus dem konfokalen Volumen diffundieren. Bei der Vereinfachung wurden die höher angeregten Zustände jeweils mit den direkt darunter liegenden Zuständen zu einem entsprechenden Zustand ($R^{++} = R_1^{++} + R_n^{++}$, $T = T_1 + T_n$, $S = S_1 + S_n$) zusammengefasst. Dies führt dazu, dass für alle Prozesse, die aus einem beliebigen angeregten Zustand ausgehen, eine summierte Geschwindigkeitskonstante $k_{X_{tot}}$ nach Gleichung 3.2-12 (S 83) (siehe Kapitel 3.2.4.1) definiert werden kann.

Die Oxidation des Radikalanionzustands kann in die Zustände S_0 , S und T führen. Die Oxidation und die Reduktion des Fluorophors können aus den Zuständen S und T erfolgen. Die Reduktion des Radikalkations führt nur in den Zustand S_0 . Bei jeder Oxidation wird zusätzlich die Photoionisation aus entsprechenden höher angeregten Zuständen (S_n , R_n^{++} , T_n) mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{oxXn} \cdot \langle I \rangle$ berücksichtigt (siehe Gleichung 3.2-12). Alle mit einem Strich markierten Geschwindigkeitskonstanten setzen sich aus einer fluorophorspezifischen und einer additivspezifischen Geschwindigkeitskonstante nach Gleichung 3.2-1 (S 58) zusammen.

Die Reaktionspfade zwischen den Zuständen S_0 , S und T mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten (k_{ISC} , k_T' , k_F , k_{IC} und k_{01}) wurden bereits in den Kapiteln 3.2.4.2 und 3.2.4.3 beschrieben. Die zusammengesetzten Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation zum Radikalkation (k_{oxtot}') und für die Reduktion des Radikalkations (k_{redtot}') wurden ebenfalls bereits in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben (Gleichungen 3.2-23 und 3.2-28). Weiterhin ist die Oxidation des ersten angeregten Singulettzustands durch Trolox thermodynamisch erlaubt (Kapitel 3.2.3.5). Deswegen muss bei der Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation der angeregten Zustände zum Radikalkation k_{oxtot}' eine von Trolox abhängige Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation des S_1 -Zustands ($k_{qoxS1(Trolox)}$) zusätzlich berücksichtigt werden. Die Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion des Fluorophors zum Radikalanion k_{redtot}' kann analog zur Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation des Fluorophors k_{oxtot}' nach

Gleichung 3.2-53 berechnet werden. Im Fall des Radikalanions ist nur die von der Additivkonzentration abhängige Geschwindigkeitskonstante k_{qred}^* relevant, weil der Radikalanionenzustand ohne *Trolox* nicht beobachtet wird.

$$k_{redtot}^* = k_{qred}^* \cdot [Q]_{Trolox} \cdot S_{1eq} \quad 3.2-53$$

Wenn zusätzlich berücksichtigt wird, dass die Reduktion des *Rh 110* in Gegenwart von *Trolox* sowohl aus dem Triplett- als auch aus dem Singulettzustand erfolgen kann, gilt für k_{redtot}^* Gleichung 3.2-54.

$$k_{redtot}^* = (k_{qredS1}^* \cdot S_{1eq} + k_{qredT1}^* \cdot T_{1eq}) \cdot [Q]_{Trolox} \quad 3.2-54$$

Die Oxidation des $R_1^{\bullet}$ -Zustands mittels eines der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Additive ist thermodynamisch verboten und muss daher nicht berücksichtigt werden (Kapitel 3.2.3.5). Stattdessen muss die Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation des Radikalanionenzustands von *Rh 110* in luftgesättigter, wässriger Lösung ohne Additive von $k_{ox0}^* = 1.8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ [63] berücksichtigt werden. Zusätzlich muss bei der Oxidation des Radikalanions analog zur Oxidation zum Radikalkation die Photoionisation aus den höher angeregten $R_n^{\bullet}$ -Zustand mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{oxRn}^* berücksichtigt werden. Grundsätzlich kann die Oxidation des $R_n^{\bullet}$ -Zustands in energetisch darunter liegende Zustände S_0 , S_1 oder T_1 führen, damit gilt für k_{oxRn}^* Gleichung 3.2-55:

$$k_{oxRn}^* = k_{oxRnS0}^* + k_{oxRnS1}^* + k_{oxRnT1}^* \quad 3.2-55$$

Da die Lebensdauer des $R_n^{\bullet}$ -Zustands nicht bekannt ist, können die zusätzlichen additivabhängigen Konstanten für die Oxidation des angeregten $R_n^{\bullet}$ -Zustands nicht vernachlässigt werden. Damit ist die gesamte Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation des Radikalanions (k_{oxtot}^*) nach Gleichung 3.2-56 definiert.

$$k_{oxtot}^* = k_{ox0}^* + (k_{oxRnS0}^* + k_{oxRnS1}^* + k_{oxRnT1}^*) \cdot \langle I \rangle = k_{ox0}^* + k_{oxRn}^* \cdot \langle I \rangle \quad 3.2-56$$

Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände S , S_0 , T , $R^{+\bullet}$ und $R^{\bullet}$ unter Gleichgewichtsbedingungen für das in Abbildung 3.2-29 dargestellte elektronische

Modell mit oben beschriebenen Randbedingungen können durch die Gleichungen 3.2-57 - 3.2-61 beschrieben werden (Herleitung dieser Gleichungen siehe (Kapitel 5.1.3)).

$$R_{eq}^{\bullet-} = S_{1eq} \cdot K_{R-} \quad 3.2-57$$

mit,

$$K_{R-} = \frac{\left(\frac{k_{ISC}}{x_{r1}} + \frac{k_{redS1}^*}{k_{redT1}^*} \right)}{\left(\frac{x_{r2}}{k_{redT1}^*} - \frac{k_{oxRnT1}^* \cdot <I>}{x_{r1}} \right)},$$

$$x_{r1} = k_T + k_{redT1}^* + k_{diff} + (k_{oxT1} + k_{oxTn} \cdot <I>),$$

$$x_{r2} = k_{diff} + k_{ox0}^* + \left(k_{oxRnS0}^* + k_{oxRnS1}^* + k_{oxRnT1}^* \right) \cdot <I>,$$

$$S_{0eq} = S_{1eq} \cdot K_{S0} \quad 3.2-58$$

mit,

$$K_{S0} = \frac{x_s - K_{R-} \cdot (k_{oxRnS1}^* \cdot <I>)}{k_{01}},$$

$$x_s = k_{koxS1} + k_{koxSn} \cdot <I> + k_{redS1}^* + k_{diff} + k_0',$$

$$k_0' = k_{ISC} + k_{IC} + k_F + k_{qS} \cdot [Q]$$

$$T_{1eq} = S_{1eq} \cdot K_T \quad 3.2-59$$

mit,

$$K_T = \frac{k_{ISC} + K_{R-} \cdot k_{oxRnT1}^* \cdot <I>}{k_T + k_{redT1}^* + k_{diff} + (k_{oxT1} + k_{oxTn} \cdot <I>)}$$

$$R_{eq}^{\bullet+} = S_{1eq} \cdot K_{R+} \quad 3.2-60$$

mit,

$$K_{R+} = \frac{(k_{koxS1} + k_{koxSn} \cdot \langle I \rangle) + K_{T1} \cdot (k_{koxT1} + k_{koxTn} \cdot \langle I \rangle)}{k_{redtot} + k_{diff}}$$

$$S_{1eq} = \frac{1}{1 + K_{S0} + K_{T1} + K_{R+} + K_{R-}} \quad 3.2-61$$

3.2.6.2 Auswertung der summierten Amplituden der Terme aller Dunkelzustände des Rh 110 in Gegenwart von Trolox

Im Rahmen dieses Kapitels wird der Radikalanionzustand des *Rh 110* untersucht. Dafür werden die summierten Amplituden der *FCS*-Terme aller Dunkelzustände des *Rh 110* in Gegenwart von Trolox (und *Trolox/A-ZBC*-Mischungen) mit Hilfe des in Kapitel 3.2.6.1 präsentierten Modells mit Radikalanion- und Radikalkationzuständen ausgewertet. Dabei werden die Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion der Singulett- und Triplettzustände mit Hilfe von *Trolox* (k_{qredS1}^* , k_{qredT1}^*) und die Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation des höher angeregten Anionzustands mit (k_{qoxRnS}^* , $k_{qoxRnT1}^*$) und ohne *Trolox* (k_{oxRnS}^* , k_{oxRnT1}^*) bestimmt.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von *Trolox* ($[Q]_{Trolox} = 50-200 \mu M$) wurden deutlich kürzere Relaxationszeiten der Dunkelzustände (nicht fluoreszierende Zustände) von *Rh 110* im Vergleich zur Diffusionszeit (t_d) beobachtet (Abbildung 3.2-27 und Abbildung 3.2-28). Deswegen kann eine einfache Gleichung, die aus einem Diffusionsterm und einem mehr exponentiellen Term besteht (Gleichung 3.2-62) für die Anpassung der in Gegenwart von *Trolox* gemessenen *FCS*-Kurven eingesetzt werden.

$$G(t_c) = 1 + G_{diff}(t_c) \cdot G_{Aexp}(t_c) \quad 3.2-62$$

mit,

$$G_{\text{exp}}(t_c) = \left(1 - A_1 + A_1 \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_{A1}}\right) - A_2 + A_2 \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_{A2}}\right) - A_3 + A_3 \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_{A3}}\right) \right),$$

$$A_{\text{dunkel}} = A_1 + A_2 + A_3,$$

$$G_{\text{diff}}(t_c) = A_{\text{diff}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D}}},$$

$$A_{\text{diff}} = 1/N$$

N = Anzahl der Fluorophore im konfokalen Volumen, die sich nicht in Triplett-, Radikalanion- oder Radikalkationzustand befinden.

t_c = Korrelationszeit

t_d = Diffusionszeit

z_0/ω_0 = Parameter, die das konfokale Messvolumen charakterisieren (z_0 = Radius des Volumens entlang der z-Achse, ω_0 = Radius des Volumens in der x-y Ebene)

$t_{A1,A2,A3}$ = Relaxationszeiten des mehrxponentiellen Terms $G_{\text{exp}(t_c)}$

$A_{\text{dunkel}} = A_1 + A_2 + A_3$ = normierte Gesamtamplitude des mehrxponentiellen Terms (sie entspricht der Summe der Besetzungswahrscheinlichkeiten der nicht fluoreszierenden Zustände (Dunkelzustände) von Rh 110)

Die normierte Gesamtamplitude des mehrxponentiellen Terms (A_{dunkel}) entspricht der Summe der Besetzungswahrscheinlichkeiten des Triplett-, des Radikalanion- und des Radikalkation-Zustands (Gleichung 3.2-63). Gleichzeitig kann die Summe der Besetzungswahrscheinlichkeiten der beiden verbleibenden Singulettzustände (A_F , fluoreszierende Zustände) mittels A_{dunkel} nach Gleichung 3.2-64 ermittelt werden.

$$A_{\text{exp}} = A_{\text{dunkel}} = R_{eq}^{\bullet-} + R_{eq}^{\bullet+} + T_{eq} \quad 3.2-63$$

$$A_F = 1 - A_{\text{dunkel}} = S_{0eq} + S_{eq} \quad 3.2-64$$

Die Summe der Besetzungswahrscheinlichkeiten aller Dunkelzustände A_{dunkel} und die Summe der Besetzungswahrscheinlichkeiten der Singulettzustände A_F für die FCS-Messungen von Rh 110 in Gegenwart von Trolox ($[Q]_{\text{Trolox}} = 50 \mu\text{M}, 100 \mu\text{M}, 200 \mu\text{M}$) und von Trolox/AZB-C-Mischungen ($[Q]_{(\text{Trolox}+\text{AZB-C})} = 100 \mu\text{M}+500 \mu\text{M}, 100 \mu\text{M}+800 \mu\text{M}, 200 \mu\text{M}+800 \mu\text{M}$) in Abhängigkeit von der Leistungsdichte sind in Abbildung 3.2-30 dargestellt. Die Amplituden A_{dunkel} und A_F können mittels der Summe der Gleichungen 3.2-59, 3.2-60 und 3.2-57 (A_{dunkel}) bzw. der Summe der

Gleichungen 3.2-61 und 3.2-58 (A_F) angepasst werden. Um bei dieser Anpassung die Anzahl der freien Parameter so weit wie möglich zu reduzieren, wurden alle Geschwindigkeitskonstanten für die Population der Singulett-, der Triplett- und Radikalkationenzustände von *Rh 110* ohne Additive und in Gegenwart von *AZB-C* festgehalten (festgehaltene Parameter sind in *Tabelle 3.2-14* (Seite 136) zusammengefasst). Zusätzlich wurde die Geschwindigkeitskonstante für die Depopulation des $R_I^{\bullet}$ -Zustands in luftgesättigter, wässriger Lösung auf $k_{ox0}^* = 1.8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ [63] fixiert. Die restlichen Geschwindigkeitskonstanten für die Population und Depopulation des Radikalanionenzustands ($k_{qredS1(Trolox)}^*$, $k_{qredT1(Trolox)}^*$ und k_{oxRnT1}^* , k_{oxRnS1}^* , k_{oxRnS0}^*) und für die Population und Depopulation des Radikalkationenzustands mittels *Trolox* ($k_{qoxS1(Trolox)}$, $k_{qR^+(Trolox)}$) wurden global über alle sechs in *Abbildung 3.2-30* dargestellten *Trolox*-Konzentrationsreihen angepasst (durchgezogene Linien in *Abbildung 3.2-30*). Die Ergebnisse der Anpassung sind in *Tabelle 3.2-11* zusammengetragen. Bei der Oxidation des höherangeregten $R_n^{\bullet}$ -Zustands konnte aufgrund der relativ großen Anregungsrate des S_I -Zustands ($k_{0I} = 650 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) nicht zwischen dem Übergang in den S_0 -Zustand oder den S_I -Zustand unterschieden werden. Für die Reaktion in den Singulettzustand ohne Additive wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{oxRnS}^* = 1.9 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ beobachtet. Die von *AZB-C* und von *Trolox* abhängige Oxidation des $R_n^{\bullet}$ -Zustands in den Singulettzustand konnte mit $k_{qoxRnS(A-AZB)}^* = 15000 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ und $k_{qoxRnS1(Trolox)}^* = 0 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ bestimmt werden. Zusätzlich zur Oxidation des Radikalanions in den Singulettzustand konnte keine Oxidation in den T_I -Zustand beobachtet werden, wobei im Rahmen der vorhandenen Datensätze eine langsame Oxidation in den T_I -Zustand mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_{oxRnT1}^* < 0.5 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ nicht ausgeschlossen werden konnte. Für die von *Trolox* abhängige Reduktion der Singulett- und Triplettzustände wurden Geschwindigkeitskonstanten von $k_{qredS(Trolox)}^* = 0.7 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ und $k_{qredT(Trolox)}^* = 4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ bestimmt.

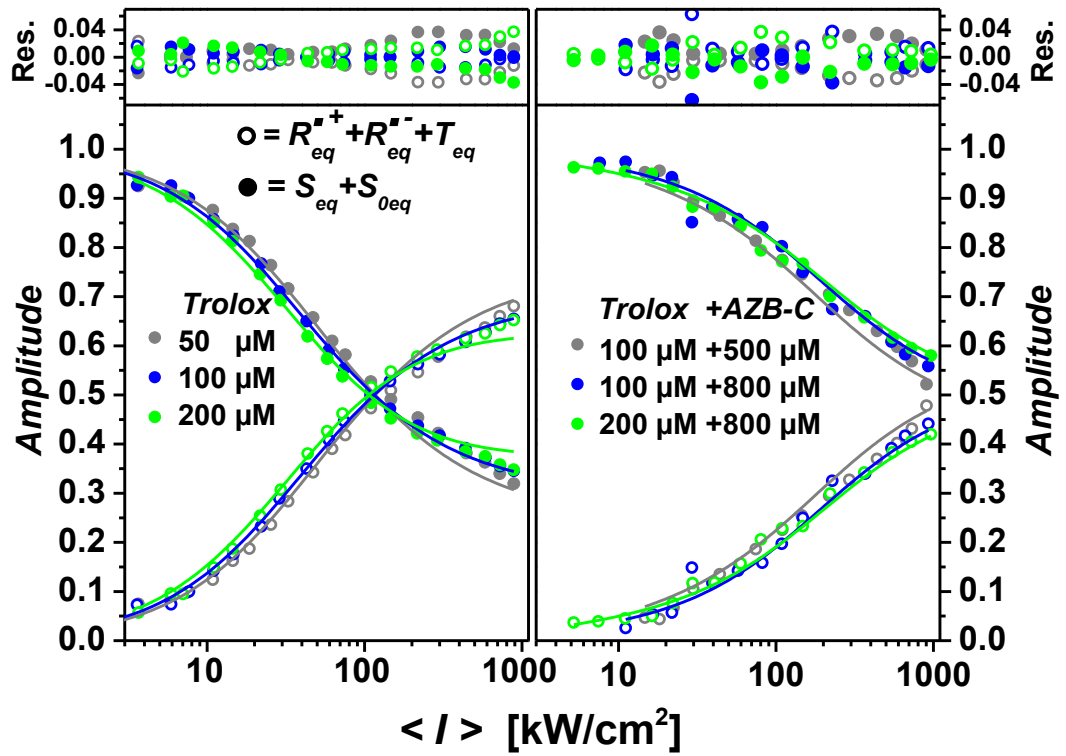


Abbildung 3.2-30 Gegen die Leistungsdichte aufgetragene normierte Amplitude A_{dunkel} von nicht fluoreszierenden Zuständen ($R_{eq}^{*+} + R_{eq}^{*-} + T_{eq}$, leere Symbole) und von fluoreszierenden Zuständen A_F ($S_{0eq} + S_{eq}$, gefüllte Symbole) von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *Trolox* (links) und in Gegenwart einer *Trolox/AZB-C*-Mischung (rechts). Durchgezogene Linien repräsentieren eine globale Anpassung der Summe der Gleichungen 3.2-59, 3.2-60, 3.2-57 an A_{dunkel} bzw. der Summe der Gleichungen 3.2-61, 3.2-58 an A_F (Modell 3a).

Die beiden Konstanten $k_{qoxS1(Trolox)}$ und $k_{qR^+(Trolox)}$ konnten bei dieser Anpassung nicht ermittelt werden. Der Grund dafür ist Gleichung 3.2-60, die sich bei großen Werten der Konstanten $k_{qoxS1(Trolox)}$ und $k_{qR^+(Trolox)}$ Gleichung 3.2-65 annähert, so dass die beiden Konstanten als einfaches Verhältnis in die Anpassung eingehen. (Bestimmung der Werte von $k_{qoxS1(Trolox)}$ und $k_{qR^+(Trolox)}$ siehe Kapitel 3.2.6.3).

$$R_{eq}^{*+} \approx S_{1eq} \cdot \frac{k_{qoxS1}}{k_{qR^+}} \quad 3.2-65$$

Tabelle 3.2-11 Spezifische Konstanten des *Rh 110* und der eingesetzten Additive, die durch die globale Anpassung der Summen der Gleichungen 3.2-59, 3.2-60, 3.2-57 und Gleichungen 3.2-61 und 3.2-58 (*Modell 3a*) an die Amplituden A_{dunkel} und A_F bestimmt wurden. In Klammern sind die Standardfehler σ_n der Anpassung für den jeweiligen Parameter angegeben.

<i>troloxspezifische Reduktion der S_1- und T_1-Zustände von <i>Rh 110</i></i>		
	$k_{\text{qred}T1(\text{Trolox})}^*$ [$10^9 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]	$k_{\text{qred}S1(\text{Trolox})}^*$ [$10^9 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]
	4 (± 1)	0.7 (± 0.4)
<i>additivspezifische Oxidation/Reduktion des höherangeregten $R_n^{\bullet-}$-Zustands</i>		
	$k_{\text{qox}RnS}^*$ [$\text{s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{M}^{-1}$]	
<i>AZB-C</i>	15000 (± 3500)	
<i>Trolox</i>	0 (± 800)	
<i>Rh 110-spezifische Oxidation des höherangeregten $R_n^{\bullet-}$-Zustands</i>		
	$k_{\text{ox}RnT1}^*$ [$\text{s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2$]	$k_{\text{ox}RnS}^*$ [$\text{s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2$]
	0 (± 0.5)	1.9 (± 0.3)

Bestimmung der maximalen Relaxationsrate des $R_n^{\bullet-}$ -Zustands

Ähnlich wie bei der Relaxationsrate des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands kann die additivabhängige Konstante $k_{\text{qox}RnS(A-AZB)}^*$ dazu verwendet werden um die Relaxationsrate des $R_n^{\bullet-}$ -Zustands zu bestimmen (siehe dazu Kapitel 3.2.4.3 S 101 Gleichung 3.2-42). Mit einer abgeschätzten Anregungsrate von $k_{Rn1^{\bullet-}} < 50 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kapitel 3.2.3.3) beträgt die maximale Relaxationsrate des $R_n^{\bullet-}$ -Zustands $k_{Rn1^{\bullet-}(\text{max})} < 2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Die geschätzte Relaxationsrate des angeregten Radikalanionzustands fällt sehr klein aus im Vergleich zu der Relaxationsrate des angeregten Radikalkationzustands ($k_{Rn1^{\bullet+}} \approx 3 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$) (Kapitel 3.2.4.3 S 101) oder des höher angeregten Singulett- bzw. Triplettzustands ($k_{Sn1} \approx k_{Tn1} \approx 5 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$). Daher ist davon auszugehen, dass die Relaxation des angeregten Radikalanionzustands mittels des Additivs *AZB-C* nicht wie angenommen über eine Stoßreaktion zwischen einem *AZB-C*-Molekül und *Rh 110*-Molekül welches sich im angeregten Radikalanionzustand befindet verläuft. Bei den verwendeten *A-AZB* Konzentrationen von $[Q] = 500 \text{ } \mu\text{M}$ bzw. $[Q] = 800 \text{ } \mu\text{M}$ in Kombination mit *Trolox* ist der Radikalanionzustand so stark entvölkert, dass praktisch kein Radikalanionzustand beobachtet wird (Kapitel 3.2.8.2

Abbildung 3.2-39). Aus diesem Grund können anhand der durchgeführten Messungen keine genaueren Angaben über die möglichen alternative Reaktionspfade¹ für die Oxidation des angeregten Radikalanionzustands durch *AZB-C* gemacht werden.

3.2.6.3 Verwendung des Radikalkation-Targetfits für FCS-Messungen von Rh110 in Gegenwart einer Trolox/AZB-C-Mischung für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{qoxS1} , k_{qR^+}

Um Werte für die Konstanten $k_{qoxS1(Trolox)}$ und $k_{qR^+(Trolox)}$ ermitteln zu können, wurden die FCS-Messungen mit *Trolox/AZB-C*-Mischungen ($[Q]_{AZB-C+Trolox} = 500+100 \mu M$, $800+100 \mu M$, $800+200 \mu M$) mittels des *Radikalkation-Targetfits* zusätzlich ausgewertet. Das Vorgehen bei der Verwendung des *Radikalkation-Targetfits* in Gegenwart einer *Trolox/AZB-C*-Mischung entspricht weitgehend dem Vorgehen bei der Verwendung des *Radikalkation-Targetfits* in Gegenwart des Additivs *AZB-C* (Kapitel 3.2.4.3).

Für die Auswertung wurde ein dem *Modell 1b* ähnliches kinetisches Modell mit Radikalanion verwendet. Dabei wurde wie bei *Modell 1b* angenommen, dass die Kinetik des Radikalkations deutlich langsamer im Vergleich zu allen anderen Zuständen ist. Damit kann der Radikalkationzustand unabhängig von allen anderen Zuständen betrachtet werden, was eine Zusammenfassung der restlichen Zustände zu einem einzigen Zustand möglich macht. Dies führt dazu, dass ein einfaches Modell, bei dem das Radikalkation mit nur einem weiteren Zustand im Gleichgewicht steht, für die Auswertung der Daten verwendet werden kann (Abbildung 3.2-31 vergleiche Kapitel 3.2.4.1 ab Seite 87). Da zusätzlich zum Triplettzustand der Radikalanionzustand berücksichtigt werden muss, beinhaltet der zusammengesetzte Zustand $STR^{\bullet-}$ (Kapitel 3.2.4) die Zustände S_0 , S_1 , T_1 und $R_1^{\bullet-}$ (*Modell 3 b*, Abbildung 3.2-31 die Zustände innerhalb von der violetten Markierung.).

¹ z. B. die Bildung eines Komplexes zwischen dem nicht angeregten Radikalanionzustand des Rhodamins und *AZB-C*, der anschließend über die Absorption eines Photons in den Anionzustand des *AZB-C* und Singulettzustand bzw. Triplettzustand des Rhodamins zerfällt.

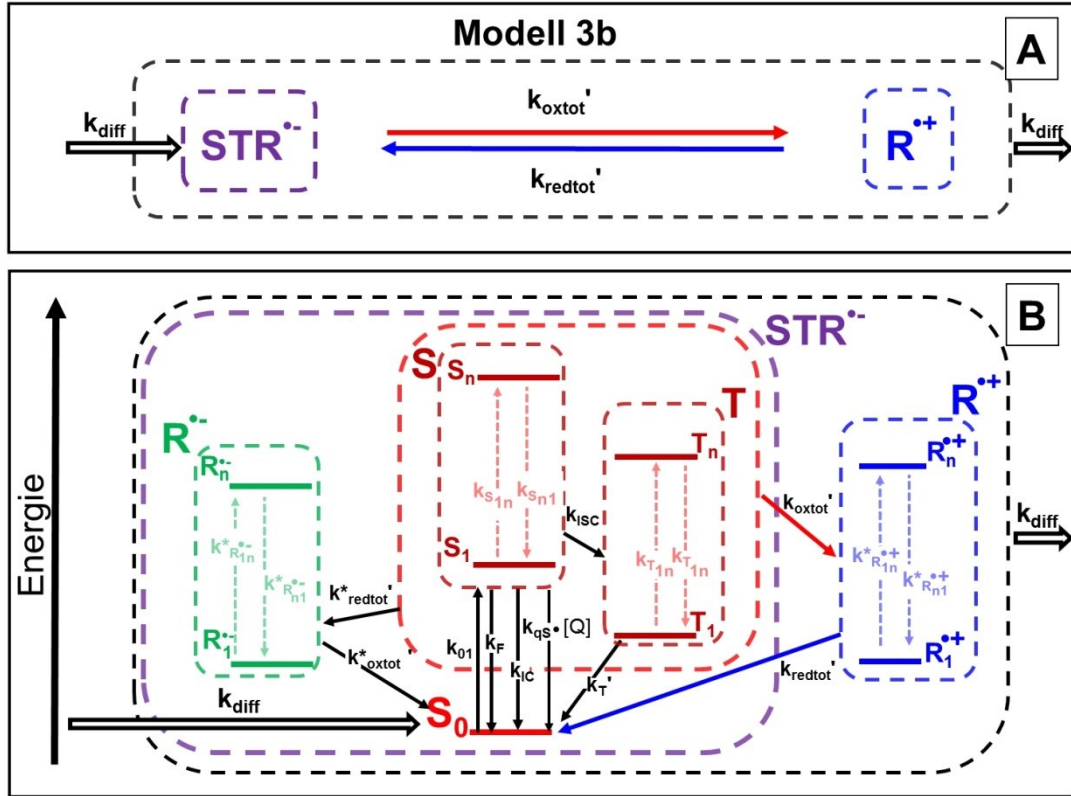


Abbildung 3.2-31 A: Das Gleichgewicht zwischen dem summierten Zustand $STR^{\bullet-}$ (Singulett-,Triplett- und Radikalanionzustand) und dem Radikalkationenzustand $R^{\bullet+}$ eines Fluorophors (Modell 3b).B: Detaillierte Darstellung der Reaktionspfade des Modells 3b mit Singulett-, Triplett-, Radikalanion- und Radikalkationenzuständen und der Austauschrate k_{diff} . Die höher angeregten Zustände werden mit den direkt darunter liegenden Zuständen zu einem entsprechenden Zustand ($R^{\bullet+} = R_1^{\bullet+} + R_n^{\bullet+}$, $T = T_1 + T_n$, $S = S_1 + S_n$) zusammengefasst. Dies führt dazu, dass für alle Prozesse, die aus einem beliebigen angeregten Zustand ausgehen, eine summierte Geschwindigkeitskonstante $k_{X_{tot}}$ nach Gleichung 3.2-12 (Seite 83) (siehe Kapitel 3.2.4.1) definiert werden kann. Die Oxidation des Anionzustands kann nur in den Zustand S_0 führen. Die Oxidation und die Reduktion des Fluorophors können aus den Zuständen S und T erfolgen. Die Reduktion des Radikalkations führt nur in den Zustand S_0 . Bei jeder Oxidation wird zusätzlich die Photoionisation aus entsprechenden, höher angeregten Zuständen (S_n , $R_n^{\bullet-}$, T_n) mit der Geschwindigkeitskonstanten $k_{oxXn} \cdot \langle I \rangle$ berücksichtigt. Alle mit einem Strich markierten Geschwindigkeitskonstanten setzen sich aus einer fluorophorspezifischen und einer additivspezifischen Geschwindigkeitskonstante nach Gleichung 3.2-1 (Seite 58) zusammen.

Für die Besetzungswahrscheinlichkeiten des zusammengesetzten Zustands $STR^{\bullet-}$ und des Radikalkationenzustands $R^{\bullet+}$ im Gleichgewicht gelten analog zu dem *Modell 1b* (Kapitel 3.2.4.1) Gleichungen 3.2-66 und 3.2-67 (vergleiche Gleichungen 3.2-32 und 3.2-33)

$$STR_{eq}^{\bullet-} = \frac{k_{redtot}' + k_{diff}}{k_{redtot}' + k_{oxtot}' + k_{diff}} \quad 3.2-66$$

$$R_{eq}^{\bullet+} = STR_{eq}^{\bullet-} \cdot \frac{k_{oxtot}'}{k_{redtot}' + k_{diff}} \quad 3.2-67$$

Die für Gleichung 3.2-24 benötigte Besetzungswahrscheinlichkeit des S_I -Zustands ist jetzt auch vom $R_I^{\bullet-}$ -Zustand abhängig. S_{Ieq} kann in diesem Fall nach Gleichung 3.2-68¹ berechnet werden.

$$S_{Ieq} = \frac{1}{1 + K_{S0} + K_{T1} + K_{R-}} \quad 3.2-68$$

$$K_{S0} = \frac{k_{diff} + k_0' + k_{qredS}^*}{k_{01}} \quad 3.2-69$$

$$K_{T1} = \frac{k_{ISC}}{k_T' + k_{diff} + k_{qredT}^*} \quad 3.2-70$$

$$K_{R-} = \frac{X_{T1} \cdot k_{qredT}^* + k_{qredS}^*}{k_{oxtot}^* + k_{diff}} \quad 3.2-71$$

$$k_{oxtot}^* = k_{oxS0}^* + (k_{oxRnS}^* + k_{qoxRnS(AZB-C)}^*) \cdot \langle I \rangle \quad 3.2-72$$

Des Weiteren wurden alle Konstanten für die Population und Depopulation der S_I -, T_I -, und $R_I^{\bullet-}$ -Zustände ohne Additive und alle *AZB-C* spezifischen Konstanten für die Population und Depopulation der T_I -, $R_I^{\bullet-}$ - und $R_I^{\bullet+}$ -Zustände sowie die *Trolox*

¹ Gleichung 3.2-68 kann analog zu Gleichung 3.2-17 hergeleitet werden (siehe Kapitel 5.1.3). Analog zum Modell das nur einen Radikalkationenzustand (Abbildung 3.2-17) umfasst, wurde angenommen, dass die Relaxation des Radikalanions nur in den S_0 -Zustand führen kann. Diese Annahme erlaubt es, k_{oxtot}^* nach Gleichung 3.2-72 zu berechnen.

spezifischen Konstanten für die Population des $R_I^{\bullet+}$ -Zustands fixiert (die Übersicht der fixierten Parameter ist in *Tabelle 3.2-14* (Seite 136) zu finden).

Für die Anpassung der *FCS*-Kurven wurde Gleichung 3.2-73 verwendet. Diese Gleichung besteht aus einem Diffusionsterm, einem Radikalkationterm und einem biexponentiellen Term ($G_{R,T}(t_c)$), der einen Tripletterm zusammen mit einem Radikalanionterm (die nicht separiert werden konnten) repräsentiert.

$$G(t_c) = \frac{1}{N_{S,R}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_d}}} \cdot G_{T,R^-}(t_c) \cdot G_{R^+}(t_c) \quad 3.2-73$$

$$G_{T,R^-}(t_c) = \left(1 - A_1 + A_1 \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_1}\right) - A_2 + A_2 \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_2}\right) \right)$$

mit $A_{T,R^-} = A_1 + A_2$, t_2 wurde durchgehend auf $t_2 = 100$ ns fixiert.

$$G_{R^+}(t_c) = \left(1 + \frac{A_{R^+}}{1 - A_{R^+}} \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_R}\right) \right)$$

$N_{S,R}$ = Anzahl der Fluorophore im Singulett- und Radikalzustand

t_c = Korrelationszeit

t_d = Diffusionszeit

t_{R^+} = Radikalkationrelaxationszeit

A_{R^+} = Radikalkationamplitude

t_1 = gemittelte Relaxationszeit der Triplet- und Radikalanionterme

A_{T,R^-} = Summierte Amplitude der Triplet- und Radikalanionterme

z_0/ω_0 = Parameter, die das konfokale Messvolumen charakterisieren (z_0 = Radius des Volumens entlang der z-Achse, ω_0 = Radius des Volumens in der x-y Ebene)

Bei der Anpassung des Radikalkationterms der Gleichung 3.2-73 wurden die Diffusionsterme und Triplet/Radikalanion-Mischterme der jeweiligen *FCS*-Kurven individuell beschrieben, indem die Parameter $1/N_{S,R}$, t_d , z_0/ω_0 , t_1 , A_1 und A_2 bei jeder einzelnen *FCS*-Kurve individuell angepasst wurden. Die zweite Relaxationszeit (t_2) des Terms $G_{R,T}(t_c)$ wurde durchgehend auf $t_2 = 100$ ns fixiert.

Genau wie beim Additiv *AZB-C* müssen bei der Anpassung des Radikalkationterms nur die thermodynamisch erlaubten Geschwindigkeitskonstanten berücksichtigt werden. In Anwesenheit von *Trolox* muss die Reduktion des $R_I^{\bullet+}$ -Zustands zusammen mit der Oxidation des S_I -Zustands berücksichtigt werden. Die Reduktion des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands ist in Gegenwart von *Trolox* ebenfalls erlaubt, wobei aufgrund der

relativ kurzen Relaxationszeit bei gleichzeitig kleiner Amplitude des Radikalkationterms in Gegenwart der *Trolox/AZB-C*-Mischung (Abbildung 3.2-28) davon ausgegangen werden kann, dass *Trolox* im Vergleich zum *AZB-C* den Radikalkationzustand sehr stark reduziert (k_{qR^+} ist sehr groß, siehe auch Kapitel 3.2.6.2). Unter solchen Bedingungen kann die Reduktion des $R_n^{\bullet+}$ -Zustands durch *Trolox* vernachlässigt werden.

Tabelle 3.2-12 Mittels Anpassung von Gleichung 3.2-73 an in Gegenwart von *Trolox/AZB-C*-Mischung gemessene *FCS-Daten* bestimmte k_{qR^+} und k_{qoxSI} für *Rh 110*

<i>Rh 110-spezifisch</i>	
$k_{qoxSI} [10^9 \cdot M^1 \cdot s^{-1}]$	0.8
$k_{qR^+} [10^9 \cdot M^1 \cdot s^{-1}]$	1.9

Bei der Anpassung des Radikalkationterms in Gegenwart einer *Trolox/AZB-C*-Mischung wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_{qR^+} und k_{qoxSI} über drei Konzentrationsreihen global angepasst. Die Anpassung ergab die in Tabelle 3.2-12 angegebene Werte. Die detaillierten Ergebnisse der Anpassung sind in Kapitel 5.5 zusammengetragen.

3.2.7 Auswertung der Amplituden der Dunkelzustände von Rh 110 in Gegenwart von A-AZB-C unter Einbeziehung des Radikalanionzustands

Genau wie bei *FCS*-Messungen von *Rh 110* in Gegenwart von Trolox wurden bei Messungen in Gegenwart von *A-AZB-C* nur Relaxationszeiten der Dunkelzustände (nicht fluoreszierende Zustände), die deutlich kürzer als die Diffusionszeit (t_d) waren, beobachtet (Abbildung 3.2-32). Dadurch konnten die *FCS*-Messungen mit *A-AZB-C* mittels Anpassung von Gleichung 3.2-62 an die individuellen *FCS*-Kurven ausgewertet werden (Kapitel 3.2.6.2), wobei in Gegenwart von *A-AZB-C* zwei exponentielle Terme und ein Diffusionsterm ausreichend waren, um die *FCS*-Kurven zu beschreiben.

Die Relaxationszeiten der beiden Exponentialterme unterschieden sich um mehr als eine Größenordnung von der Diffusionszeit, so dass die beiden exponentiellen Terme und der Diffusionsterm leicht mittels Gleichung 3.2-62 unabhängig voneinander angepasst werden konnten. Die Relaxationszeiten des ersten exponentiellen Terms lagen in Bereich von $t_{AI} = 0.1 - 2 \mu s$ während die Relaxationszeiten des zweiten Terms im Bereich von $t_{AI} = 2 - 25 \mu s$ lagen. Mit steigender Konzentration von *A-AZB-C* nahmen die Amplituden der beiden Terme ab. In Gegenwart von *A-AZB-C* ist die Reduktion der angeregten Singulett-, Triplett- und Radikalkationzustände des *Rh 110* thermodynamisch erlaubt (Kapitel 3.2.3.5). Deswegen müssen die Triplett-, Radikalanion- und Radikalkationzustände bei der Auswertung der *FCS*-Messungen berücksichtigt werden. Wie in Gegenwart von Trolox (Kapitel 3.2.6.2) entspricht die summierte Amplitude der beiden exponentiellen Terme A_{dunkel} der summierten Besetzungswahrscheinlichkeit der nicht fluoreszierenden Zustände ($R^{\bullet-}$, $R_I^{\bullet+}$, T), während $1 - A_{dunkel} = A_F$ der summierten Besetzungswahrscheinlichkeit der Singulett-Zustände ($S_0 + S_I$) entspricht.

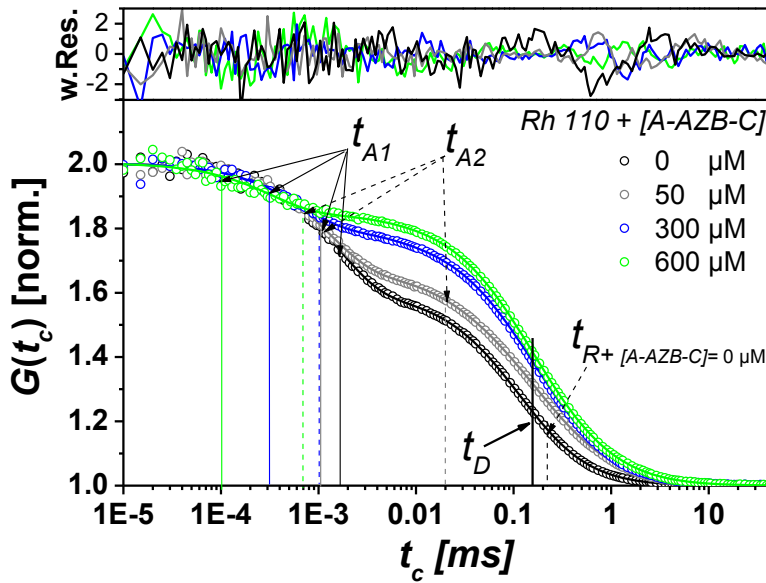


Abbildung 3.2-32 FCS-Daten (Punkte) von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive und in Gegenwart des Additivs *A-AZB-C* bei einer Leistungsdichte von $\langle I \rangle \approx 100 \pm 10 \text{ kW/cm}^2$. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassung von Gleichung 3.2-73 an die FCS-Daten.

3.2.7.1 Auswertung unter der Annahme einer vernachlässigbaren Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalanionzustands

Bei bereits publizierten Untersuchungen der Wirkung des Additivs *A-AZB-C* auf *Rh 123* wurde angenommen, dass die Besetzung des Radikalanionzustands vernachlässigt werden kann [24]. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion des Radikalkations und die Löschung des Triplettzustands wurden dabei mit $k_{qT(A-AZB-C, Rh123)} = 3.9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. $k_{qR+(A-AZB-C, Rh123)} = 0.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ angegeben.

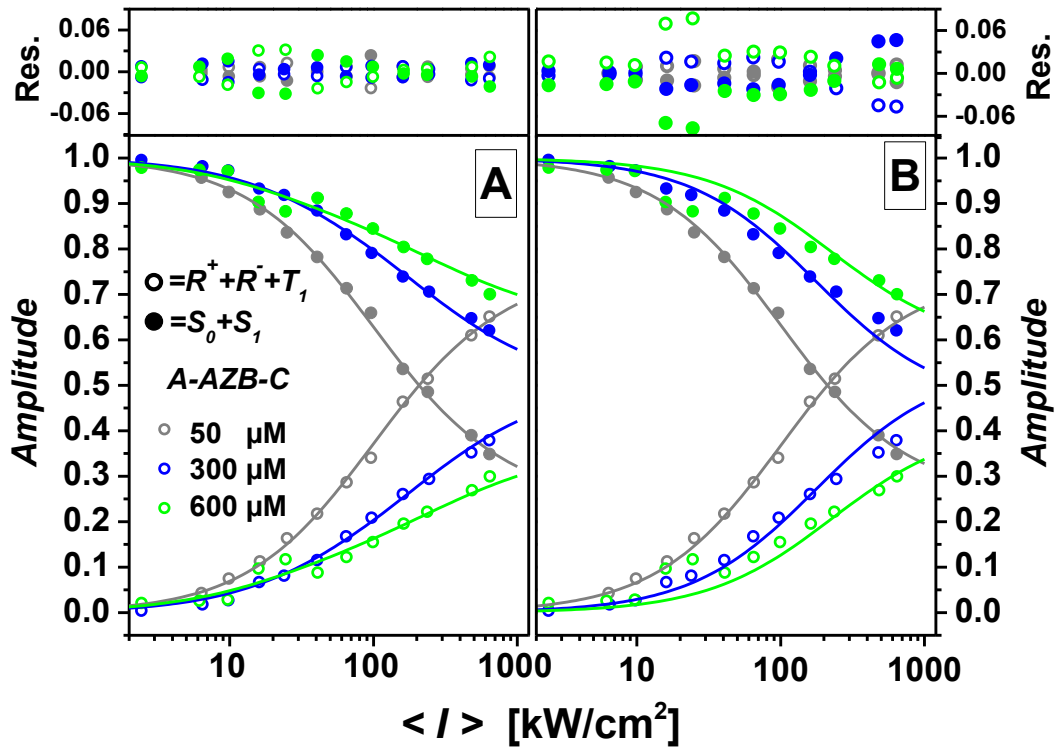


Abbildung 3.2-33 Gegen die Leistungsdichte aufgetragene, normierte Amplitude A_{dunkel} der nicht fluoreszierenden Zustände ($R_{eq}^{*+} + R_{eq}^{*-} + T_1$, leere Symbole) und der fluoreszierenden Zustände A_F ($S_{0eq} + S_{eq}$, gefüllte Symbole) von *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *A-AZB-C*. Die durchgezogenen Linien repräsentieren eine globale Anpassung der Summe der Gleichungen 3.2-59, 3.2-60 und 3.2-57 an A_{dunkel} bzw. der Summe der Gleichungen 3.2-61 und 3.2-58 (*Modell 3a*) an A_F . Im Teil A wurde die Besetzung des Anionenzustands nicht zugelassen. Im Teil B wurde die Besetzung des Anionenzustands erlaubt.

Mit der Annahme einer vernachlässigbaren Besetzung des R_I^{*-} -Zustands ergibt eine globale Anpassung der Summe der Gleichungen 3.2-59, 3.2-60 und 3.2-57 und der Summe der Gleichungen 3.2-61 und 3.2-58 (*Modell 3a*) an A_F und A_{dunkel} für die global angepassten Geschwindigkeitskonstanten $k_{qT(A-AZB-C)} = 2.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_{qR+(A-AZB-C)} = 5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Abbildung 3.2-33 B).

Aufgrund sehr starker Löschung des Radikalkationenzustands werden sehr kleine Amplituden des Radikalkationenzustands in Gegenwart von *A-AZB-C* beobachtet. Deswegen liefert die Anpassung der Amplituden in diesem Fall einen sehr großen Standardfehler bei der Geschwindigkeitskonstante k_{qR+} von $\sigma_n(k_{qR+}) = 5 \cdot 10^9$. Eine zusätzliche Auswertung der Relaxationszeiten und der Amplituden des Radikalkationenzustands mittels *Radikalkation-Targetfits* (Kapitel 3.2.4.3) mit einer auf $k_{qT(A-AZB-C)} = 2.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ fixierten Geschwindigkeitskonstante für die Depopulation des Triplettzustands ergibt für die Geschwindigkeitskonstante k_{qR+} einen Wert von $k_{qR+(A-AZB-C)} = 0.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2.7.2 Auswertung unter der Annahme einer nicht vernachlässigbaren Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalanionzustands

Wird die Besetzung des Radikalanionzustands zugelassen, so ergibt die Anpassung (Abbildung 3.2-33 B) der Summe der Gleichungen 3.2-59, 3.2-60 und 3.2-57 und der Summe der Gleichungen 3.2-61 und 3.2-58 (*Modell 3a*) an A_F und A_{dunkel} die in Tabelle 3.2-13 zusammengetragenen Geschwindigkeitskonstanten.

Tabelle 3.2-13 Konstanten für die Depopulation bzw. Population der Triplett-, Radikalkation-, und Radikalanionzustände von *Rh 110* in Gegenwart von *A-AZB-C*.

<i>Auswertung mit Anionzustand</i>		
$k_{qT(A-AZB-C)}$ [$10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$]	$k_{qR^+(A-AZB-C)}$ [$10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$]	$k_{qoxnS(A-AZB-C)}^*$ [$s^{-1} \cdot cm^2 \cdot W^{-1} \cdot M^{-1}$]
4.0 (± 0.2)	1.3 (± 0.2)	4600 (± 2000)
$k_{qredT(A-AZB-C)}^*$ [$10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$]	$k_{qredS(A-AZB-C)}^*$ [$10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$]	
≈ 0 (± 0.2)	0.6 (± 0.2)	
<i>Auswertung ohne Anionzustand</i>		
$k_{qT(A-AZB-C)}$ [$10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$]		$k_{qR^+(A-AZB-C)}$ [$10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$]
2.7 (± 0.1)		0.5

Die Auswertungen mit und ohne Radikalanionzustand liefern leicht unterschiedlichen Besetzungswahrscheinlichkeiten der einzelnen, elektronischen Zustände (Abbildung 3.2-34). Wird die Besetzung des Radikalanionzustands bei der Auswertung der Amplituden berücksichtigt, so wird eine maximale Amplitude des Radikalanionzustands bei der größten verwendeten Konzentration des Additivs ($[Q]_{A-AZB-C} = 600 \mu M$) von $R^* < 0.1$ gefunden. Gleichzeitig unterscheiden sich die Summen der Besetzungswahrscheinlichkeiten, die für die Auswertung in beiden Fällen verwendet werden müssen, nur unwesentlich voneinander, so dass die Anpassungen mit und ohne Radikalanionzustand ähnliche Residuen aufweisen (Abbildung 3.2-33 A und B). Dies spricht dafür, dass die Besetzung des Radikalanionzustands in Gegenwart von *A-AZB-C*, im Rahmen der Fehlergrenzen der verwendeten Methoden, vernachlässigt werden kann. Deswegen werden nur die Ergebnisse der Auswertung ohne den Radikalanionzustand für weitere Diskussionen verwendet.

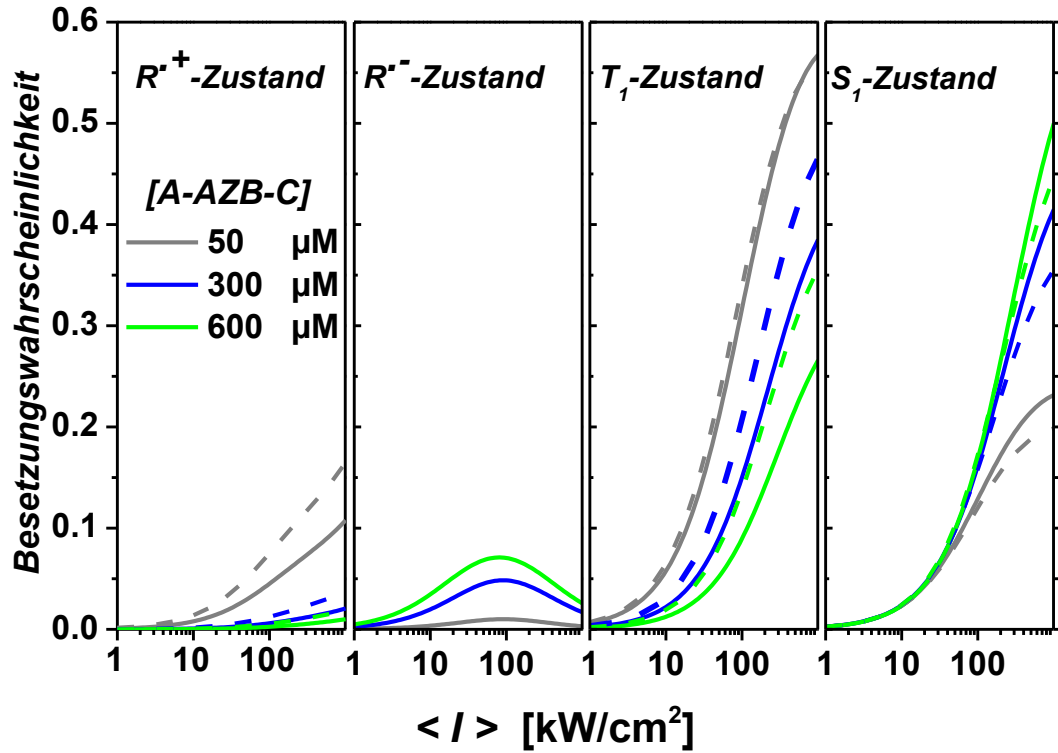


Abbildung 3.2-34 Besetzung der elektronischen Zustände des *Rh 110* in Gegenwart des Additivs *A-AZB-C*. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten wurden mit Hilfe von Gleichungen 3.2-57-3.2-61 (*Modell 3a*) zusammen mit in Tabelle 3.2-13 und Tabelle 3.2-14 (Seite 134 und 136) angegebene Konstanten berechnet. Für Austauschrate k_{diff} wurde ein konstanter Wert von $k_{diff} = 6500 s^{-1}$ verwendet. Die durchgezogene Linien repräsentieren Auswertung unter der Annahme einer nicht vernachlässigbaren Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalanionzustands, während die gestrichelte Linien die Auswertung ohne den Radikalanionzustand repräsentieren.

3.2.8 Abschließende Diskussion für die Anwendung der Additive zur Fluoreszenzsignalsteigerung des Rh 110

3.2.8.1 Zusammenfassung der ermittelten kinetischen Parameter des Rh 110 mit und ohne Additive

Alle bei der Untersuchung des Rh 110 und der Additive ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 3.2-14 zusammengefasst.

Tabelle 3.2-14 Zusammenfassung aller für das Fluoreszenzsignal relevanten Geschwindigkeitskonstanten für die Population und Depopulation der elektronischen Zustände von Rh 110 in Phosphatpuffer (25 mM, pH 7). Die im Klammern angegebenen Standardfehler stammen aus den Anpassungen die mit Origin vorgenommen worden sind. Der Radikalkation-Targetfit wurde mittels eines Matlabskripts durchgeführt, bei dem diese Angabe nicht erhältlich war.

Rh 110 spezifische Konstanten					
k_F [$10^8 \cdot s^{-1}$]	k_{IC} [$10^8 \cdot s^{-1}$]	k_{0I} [$cm^2 \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}$]	$\Phi_{F(H_2O)}^a$	k_{ISC} [$10^5 \cdot s^{-1}$]	k_T [$10^5 \cdot s^{-1}$]
2.25	0.25	650	0.89	14 (± 0.6)	3.7 (± 0.04)
k_{red0} [s^{-1}]	k_{ox0}^b [s^{-1}]	k_{oxn}^b [$cm^2 \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}$]	k_{oxS0}^{*c} [$10^5 \cdot s^{-1}$]	k_{oxRnS}^{*} [$s^{-1} \cdot W^{-1} \cdot cm^2$]	
1500	25000	0.01 (± 0.0015)	1.8	1.9 (± 0.3)	
Additiv spezifische Konstanten					
Konstante	Einheit	A-AZB-C	AZB-C	Trolox	
k_{qT}	[$10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]	2.7	2.6		
k_{qoxSI}	[$10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]		0.004	0.8	
k_{qR^+}	[$10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]	0.5	0.003	1.9	
k_{qRn^+}	[$cm^2 \cdot W^{-1} \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]	^d	19	^d	
k_{qredTl}^*	[$10^9 \cdot s^{-1} \cdot M^{-1}$]			4 (± 1)	
k_{qredSI}^*	[$10^9 \cdot s^{-1} \cdot M^{-1}$]			0.7 (± 0.4)	
k_{qoxRnS}^*	[$cm^2 \cdot W^{-1} \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]		15000 (± 3500)	≈ 0 (± 800)	

^aKapitel 3.2.3.1

^bdiese Konstanten setzen sich aus den Geschwindigkeitskonstanten aus den Triplett- und Singulettzuständen nach Gleichung 3.2-38 bzw. der Gleichung 3.2-39 zusammen (Kapitel 3.2.4.3) mit $k_{oxSI} = k_{oxTl} = 5200 s^{-1}$ bzw. $k_{oxSn} = k_{oxTn} = 0.002 cm^2 \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}$

^c[63]

^d k_{qRn^+} konnte aufgrund der großen Geschwindigkeitskonstante k_{qR^+} in Gegenwart von Trolox und A-AZB-C nicht bestimmt werden.

3.2.8.2 Die Besetzung der elektronischen Zustände und der daraus resultierenden Fluoreszenzzählrate des Rh 110 in Gegenwart der Additive

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der elektronischen Zustände des Fluorophors *Rh 110* zeigte, dass ähnlich wie beim bereits untersuchten *Rh 123* [24] die reversiblen Triplett- und Radikalkation-Zustände entscheidend das Fluoreszenzsignal des Fluorophors in einer luftgesättigten Lösung beeinflussen. Vor allem der Radikalkationzustand wird aufgrund seiner langen Lebensdauer ($\geq$ ms) verstärkt populiert, was eine schnelle Sättigung der Besetzung aller anderen Zustände zur Folge hat. Gleichzeitig können bei Messungen an einem konfokalen Fluoreszenzaufbau mit frei durch das Detektionsvolumen diffundierenden Fluorophoren, die Fluorophore, die sich im langlebigen (oder irreversiblen) nicht fluoreszierenden Zustand befindet, schnell gegen Fluorophore, die sich im Singulettgrundzustand befinden, ausgetauscht werden. Dies hat zur Folge, dass die Austauschrate die Fluoreszenzzählrate beeinflusst. Gleichzeitig ist die Austauschrate von der Größe des Detektionsvolumens und daher von der Konfiguration der verwendeten Apparatur abhängig. Um die Fluoreszenzzählrate unabhängig von der Konfiguration des verwendeten Fluoreszenzaufbaus betrachten zu können¹, wird im Rahmen dieser Diskussion Einfachheit halber die Fluoreszenzzählrate unter den Bedingungen, bei denen die Austauschrate vernachlässigbar ist, betrachtet. Dafür wird die Fluoreszenzzählrate mit Hilfe der Gleichung 3.2-44 ausgerechnet. Für die Bestimmung der Besetzungswahrscheinlichkeit S_{1eq} werden die hergeleiteten kinetische Modelle *Modell 1a* (Gleichungen 3.2-13-3.2-17) bzw. *Modell 3a* (Gleichungen 3.2-57-3.2-61) mit auf $k_{diff} = 0$ fixierter² Austauschrate und die unter

¹ Zusätzlich sind die direkt aus FCS-Messungen bestimmte Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(FCS)$ speziell bei höheren Anregungsleistungsdichten stark verzerrt (Kapiteln 2.4.2, 3.2.5.2 und 3.2.5.3). Die für die Korrektur $F_{cpm}(FCS)$ notwendigen Messungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht für alle Messreihen durchgeführt werden. Einen qualitativen Vergleich zwischen direkt gemessenen $F_{cpm}(FCS)$ und berechneten $F_{cpm}(ideal)$ bei allen durchgeführten Messreihen siehe Anhang-Kapitel 5.7)

² Aufgrund der Tatsache, dass k_{diff} im Rahmen des Modells mit Radikalkation und Photozersörung (Kapitel 3.2.4.1) allein im Nenner der Gleichung 3.2-16 steht, konnte k_{diff} nicht einfach auf null gesetzt werden. Stattdessen wurde ein sehr kleiner Wert für Austauschrate von $k_{diff} = 10^{-20} \text{ s}^{-1}$ verwendet.

FCS-Messbedingungen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten verwendet (Tabelle 3.2-14, Seite 136).

$$F_{cpm} = G_{detect} \cdot k_F \cdot S_{leq} \quad (\text{Gleichung 3.2-44})$$

$$G_{detect} = 0.02 \text{ (Kapitel 3.2.3.11)}$$

Die auf diese Weise bestimmte Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$ repräsentiert die „ideale“ Fluoreszenzzählrate eines immobilisierten Fluorophors unter *MFD*-Bedingungen, die weder von der fluoreszenzsignalsättigungsbedingten Verzerrung des Detektionsvolumens (Kapitel 2.4.2), noch von der Anregung der dunklen Zustände bzw. Konzentrationsänderungen außerhalb des Anregungsvolumens (Kapitel 3.2.5.2 und Kapitel 3.2.5.3) beeinflusst wird¹.

In Abbildung 3.2-35 ist die Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$ (Kapitel 3.2.3.14) für alle verwendete Additive abgebildet. Die Löschung der langlebigen, nicht fluoreszierenden Zustände führte zu einer eindeutigen $F_{cpm}(ideal)$ Steigerung in Gegenwart aller verwendeten Additive. Die Einordnung der Additive nach ihrer Fähigkeit die Fluoreszenzzählrate des *Rh 110* zu steigern, ergibt sich aus deren Fähigkeit, die dunklen Zustände des *Rh 110* zu Löschen ohne selbst welche zu induzieren. Damit wird in Gegenwart des Additivs *A-AZB-C* die größte Fluoreszenzsignalsteigerung beobachtet. Für alle verwendeten Additive ergibt sich die folgende Reihenfolge:

- A-AZB-C
- Trolox/AZB-C-Mischung
- Trolox
- AZB-C

¹ Zu beachten ist, dass die Sättigungseffekte zusammen mit den Effekten der Photozerstörung die mittels *FCS* Fluoreszenzzählrate um mehr als eine Größenordnung verfälschen können (Kapitel 3.2.5). Im Vergleich dazu werden deutlich kleinere Fehler bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten aus den normierten Amplituden der Korrelationsterme beobachtet [24] (siehe auch Standardfehler in Tabelle 3.2-14).

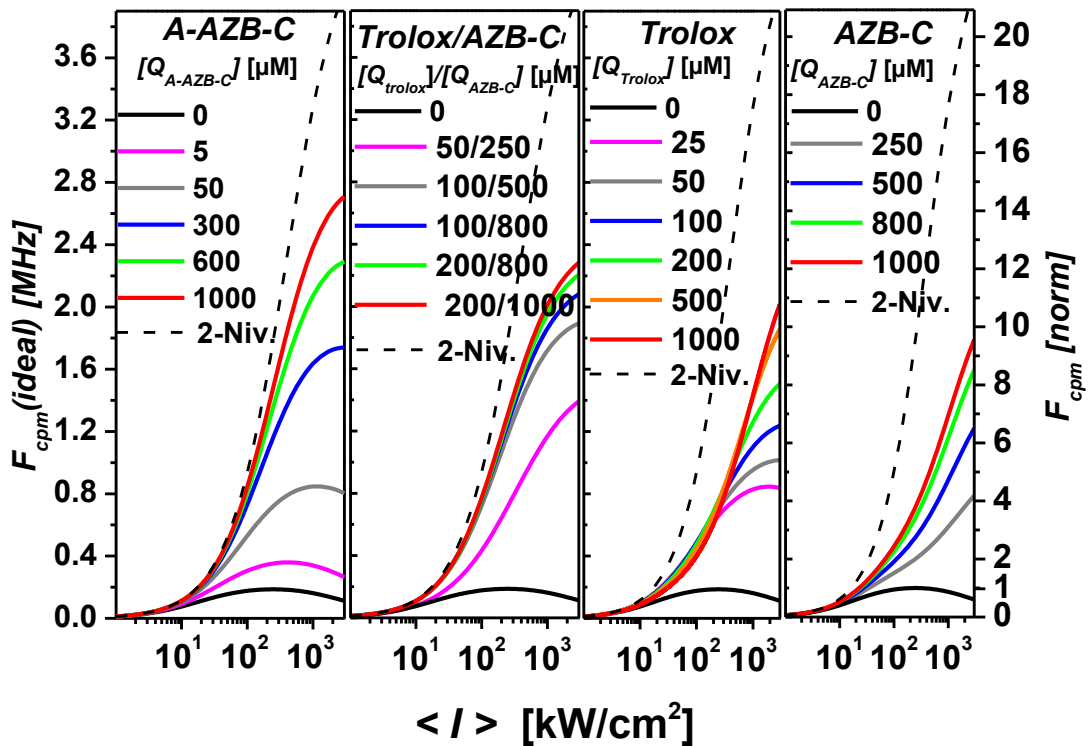


Abbildung 3.2-35 Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$ von *Rh 110* mit und ohne Additive. $F_{cpm}(ideal)$ wurde mit Hilfe von Gleichung 3.2-44 (mit $G_{detect} = 0.02$) und den in Tabelle 3.2-14 (Seite 136) angegebenen Konstanten berechnet. Die für Gleichung 3.2-44 notwendige Besetzungswahrscheinlichkeit des S_I -Zustands wurde mit Hilfe des Modells 3a nach Gleichung 3.2-61 (Seite 121) bestimmt, wobei für die Austauschrate $k_{diff} = 0$ eingesetzt wurde. Die durch Farben Grau, Grün, Blau und Schwarz dargestellten, durchgezogenen Kurven repräsentieren die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen verwendeten Konzentrationen der Additive. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Verlauf der theoretisch maximal möglichen Besetzung des S_I -Zustands bei einem hypothetischen 2-Niveausystem (S_0-S_I) System (Gleichung 3.2-45, Seite 103)

Die stärkste Steigerung der Fluoreszenzzählrate konnte in Gegenwart des *A-AZB-C*, beobachtet werden. Der Grund dafür ist die Fähigkeit des *A-AZB-C*, sowohl den Triplett- als auch den Radikalkationenzustand zu entvölkern. Bereits bei einer Zugabe von $50 \mu M$ *A-AZB-C* wird der Radikalkationenzustand soweit entvölkert, dass der Triplettzustand anstatt des Radikalkationenzustands die Besetzung der elektronischen Zustände dominiert. Die weitere starke Steigerung der Fluoreszenzzählrate des *Rh 110* in Gegenwart von höheren Konzentrationen des *A-AZB-C* erfolgt hauptsächlich aufgrund der Triplettzustand löschenden Eigenschaft des Additivs (Abbildung 3.2-36). Theoretisch kann durch immer weitere Erhöhung der Konzentration des *A-AZB-C* fast die komplette Löschung aller nichtfluoreszierenden Zustände erreicht werden, was zur Folge hätte, dass die maximals mögliche Besetzung des S_I -Zustands eines 2-Niveaus Systems und damit auch die maximals mögliche

Fluoreszenzzählrate des *Rh 110* erreicht wäre (vergleiche Gleichung 3.2-45, Seite 103).

Für Fluoreszenzmessungen in wässrigen Lösung muss dabei berücksichtigt werden, dass sowohl *A-AZB-C* als auch *AZB-C* nur bis zu einer Konzentration von etwa $[Q] = 1 \text{ mM}$ löslich sind, und es deswegen nicht möglich sein wird, in einer in wässriger Lösung die maximalmögliche Fluoreszenzzählrate des *Rh 110* (Fluoreszenzzählrate eines hypothetischen 2-Niveaus Systems) zu erreichen. Zusätzlich wird ab einer Additivkonzentration von $[Q] > 1 \text{ mM}$ die Löschung der Singulettzustände durch die Additive relevant [24]. Weil im Rahmen dieser Arbeit die Messungen unterhalb dieser Konzentration durchgeführt werden konnten, ist die Löschung des Singulettzustands durch ein Additiv in den hergeleiteten Modellen zwar enthalten, wird aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter diskutiert.

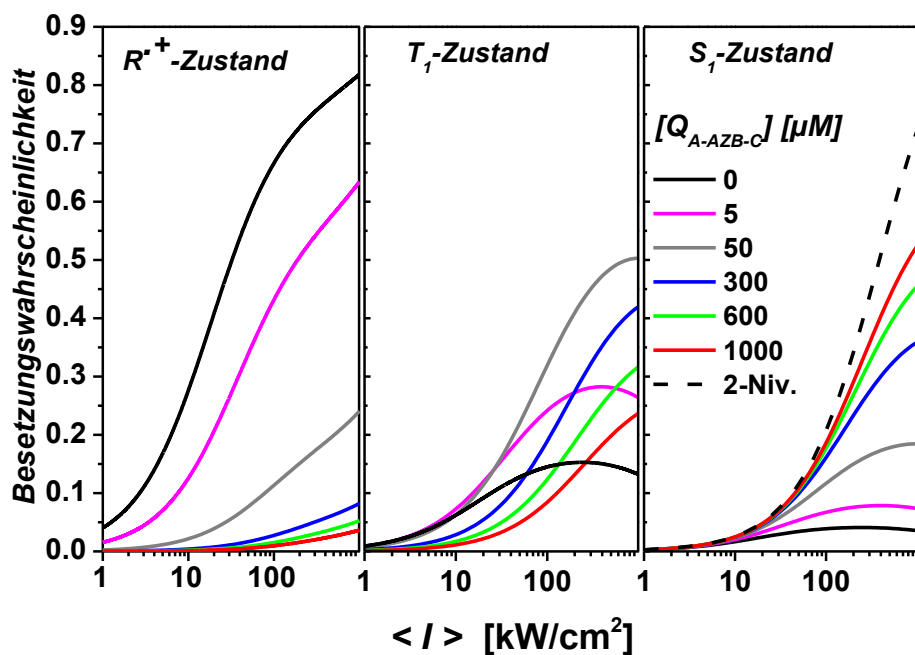


Abbildung 3.2-36 Besetzung der elektronischen Zustände des *Rh 110* in Gegenwart des Additivs *A-AZB-C*. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten wurden mit Hilfe des Modells 3a (Gleichungen 3.2-57-3.2-61 (Seite 121)) und der in Tabelle 3.2-14 (Seite 136) angegebenen Konstanten berechnet. Für die Austauschrate k_{diff} wurde ein konstanter Wert von $k_{diff} = 0$ eingesetzt. Alle Geschwindigkeitskonstanten für die Photozerstörung wurden auf 0 fixiert. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Verlauf der theoretisch maximal möglichen Besetzung des S_1 -Zustands bei einem hypothetischen 2-Niveaus (S_0 - S_1) System (Gleichung 3.2-45, Seite 103). Die durch Farben Grau, Grün, Blau und Schwarz dargestellten, durchgezogenen Kurven repräsentieren die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen verwendeten Konzentrationen der Additive.

Das Additiv *AZB-C* ist genauso gut wie das Additiv *A-AZB-C* in der Lage, den Triplettzustand des *Rh 110* zu löschen. Allerdings ist *AZB-C* im Vergleich zu allen

anderen Additiven am wenigsten in der Lage, den Radikalkationenzustand des *Rh 110* zu beeinflussen (Kapitel 3.2.4.3). Die dominierende Rolle des Radikalkationenzustands bei der Besetzung der elektronischen Zustände des *Rh 110* führt dazu, dass die Löschung des Triplettzustands zu einer vergleichsweise geringen Steigerung der Fluoreszenzzählrate führt (Abbildung 3.2-37). Zusätzlich muss in Gegenwart des Additivs *AZB-C* berücksichtigt werden, dass bei hohen Leistungsdichten die Reduktion des höher angeregten Radikalkations zu einer zusätzlichen Entvölkerung des dominierenden Radikalkationenzustands führt (Sinkende Radikalkationamplituden bei hohen Leistungsdichten in Abbildung 3.2-37). Diese Reduktion des höher angeregten Radikalkations konnte nur in Gegenwart des Additivs *AZB-C* beobachtet werden. In Gegenwart der beiden anderen Additive *A-AZB-C* und *Trolox* führt die niedrige Population des Radikalkations dazu, dass die Reduktion des angeregten Radikalkations vernachlässigbar wird.

In Gegenwart von *Trolox* wurde im Vergleich zu allen anderen Additiven die größte Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion des Radikalkationenzustands von $k_{qR^+}(Trolox) = 1.9 \cdot 10^9 \cdot s^{-1} \cdot M^{-1}$ beobachtet. Bei kleinen Additivkonzentrationen ($[Q] \approx 10\text{-}50 \mu M$) fällt dementsprechend die Steigerung der Fluoreszenzzählrate ähnlich stark aus wie beim Additiv *A-AZB-C* (Abbildung 3.2-35). Bei höheren Additivkonzentrationen ($[Q] > 50 \mu M$) fällt die Besetzung des Radikalkationenzustands in Gegenwart von *Trolox* im Vergleich zur Besetzung des Radikalkationenzustands in Gegenwart von *A-AZB-C* trotz größerer Geschwindigkeitskonstante k_{qR^+} stärker aus. Der Grund dafür ist eine zusätzliche Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation des S_I -Zustands durch *Trolox* ($k_{qoxSI}(Trolox) = 0.8 \cdot 10^9 s^{-1} \cdot M^{-1}$).

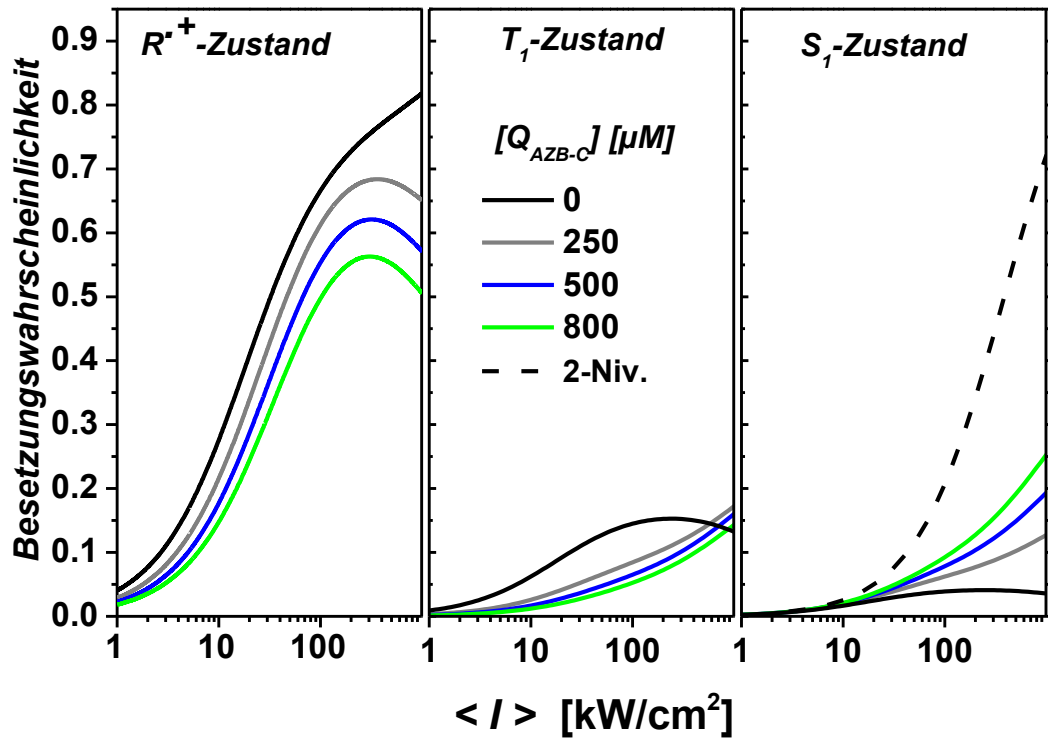


Abbildung 3.2-37 Besetzung der elektronischen Zustände des *Rh 110* ohne Additive (schwarze Linie) und mit Additiv *AZB-C* (farbige Linien). Die Besetzungswahrscheinlichkeiten wurden mit Hilfe des Modells 1a (Gleichungen 3.2-13-3.2-17, Seite 84) und den in Tabelle 3.2-14 (Seite 136) angegebenen Werten berechnet. Für die Austauschrate k_{diff} wurde ein konstanter Wert von $k_{diff} = 0$ eingesetzt. Alle Geschwindigkeitskonstanten für die Photozerstörung wurden auf 0 fixiert. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Verlauf der theoretisch maximal möglichen Besetzung des S_1 -Zustands bei einem hypothetischen 2-Niveaus (S_0 - S_1) System (Gleichung 3.2-45, Seite 103).

Beides, die starke Oxidation des Singulettzustands und die starke Reduktion des Radikalkationenzustands durch *Trolox*, führten dazu, dass die Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalkationenzustands bereits ab einer Konzentration des *Trolox* von $[Q] = 50 \mu\text{M}$ fast ausschließlich von dem Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten $k_{qoxS1(Trolox)}$ und $k_{qR+(Trolox)}$ bestimmt wird (vergl. Gleichung 3.2-60). Dies hat zur Folge, dass die Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalkationenzustands über einen großen Bereich der Konzentration des *Trolox* konstant bleibt (Abbildung 3.2-38). Zusätzlich zur Reduktion des Radikalkationenzustands wird in Gegenwart von *Trolox* eine starke Reduktion des T_1 -Zustands ($k_{qredT(Trolox)}^* = 4.5 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) beobachtet, wobei die Löschung des Triplettzustands durch *Trolox* im Vergleich zu *A-AZB-C* bzw. *AZB-C* nicht nach dem Dexter-Mechanismus [24] verläuft, sondern zu der Besetzung des Radikalanionenzustands führt (Kapitel 1.1.3.2). Dadurch wird keine so starke Besetzung des S_1 -Zustands in Gegenwart von *Trolox* im Vergleich zur Besetzung des

S_I -Zustands in Gegenwart von A -AZB- C beobachtet. Die zusätzliche Besetzung des Radikalanionzustands bewirkt sogar ab einer Troloxkonzentration von $[Q] = 200 \mu\text{M}$ eine Verringerung der Fluoreszenzzählrate bei niedrigen Leistungsdichten (Abbildung 3.2-38).

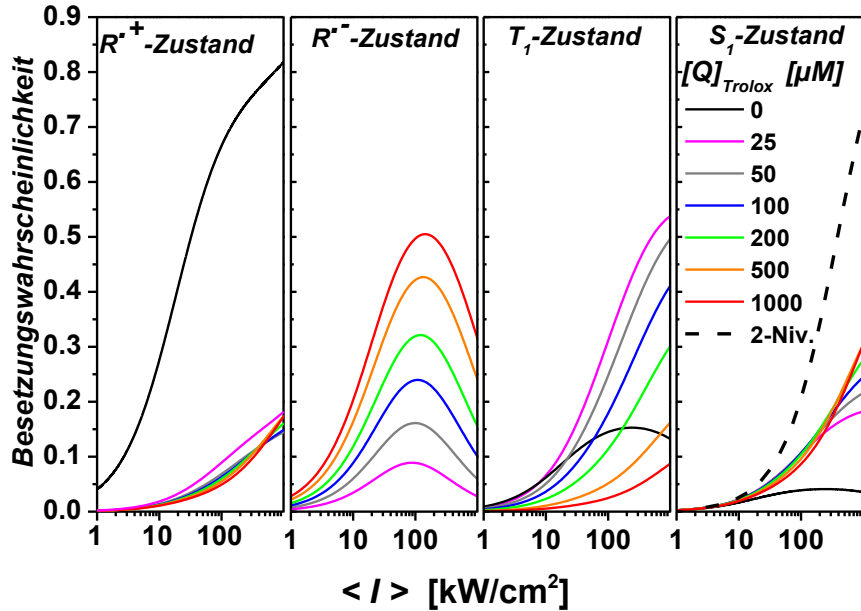


Abbildung 3.2-38 Besetzung der elektronischen Zustände des *Rh 110* in Gegenwart des Additivs *Trolox*. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten wurden mit Hilfe des *Modells 3a* (Gleichungen 3.2-57-3.2-61 (Seite 121)) und den in *Tabelle 3.2-14* (Seite 136) angegebenen Konstanten berechnet. Für die Austauschrate k_{diff} wurde ein konstanter Wert von $k_{diff} = 0$ eingesetzt. Alle Geschwindigkeitskonstanten für die Photozerstörung wurden auf 0 fixiert. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Verlauf der theoretisch maximal möglichen Besetzung des S_I -Zustands bei einem hypothetischen 2-Niveaus (S_0 - S_I) System (Gleichung 3.2-45, Seite 103). Die durch Farben Grau, Grün, Blau und Schwarz dargestellten, durchgezogenen Kurven repräsentieren die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen verwendeten Konzentrationen der Additive.

Bei höheren Leistungsdichten kann bei Troloxkonzentration von $[Q] > 200 \mu\text{M}$ dennoch die Fluoreszenzzählrate steigen, weil der Radikalanionzustand über eine zusätzliche Photooxidation des angeregten Radikalanions entvölkert wird ($k_{oxRnS}^* = 1.7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2$).

Beim Einsatz einer *Trolox*/*AZB-C*-Mischung wird neben der einfachen Kombination der bereits diskutierten Wirkungen der beiden Additive zusätzlich eine starke Löschung des Radikalanions durch *AZB-C* über den höherangeregten Radikalkationzustand beobachtet, so dass die Besetzungswahrscheinlichkeit des

Radikalanionenzustands deutlich kleiner als in Gegenwart von *Trolox* ohne *AZB-C* allein ausfällt¹.

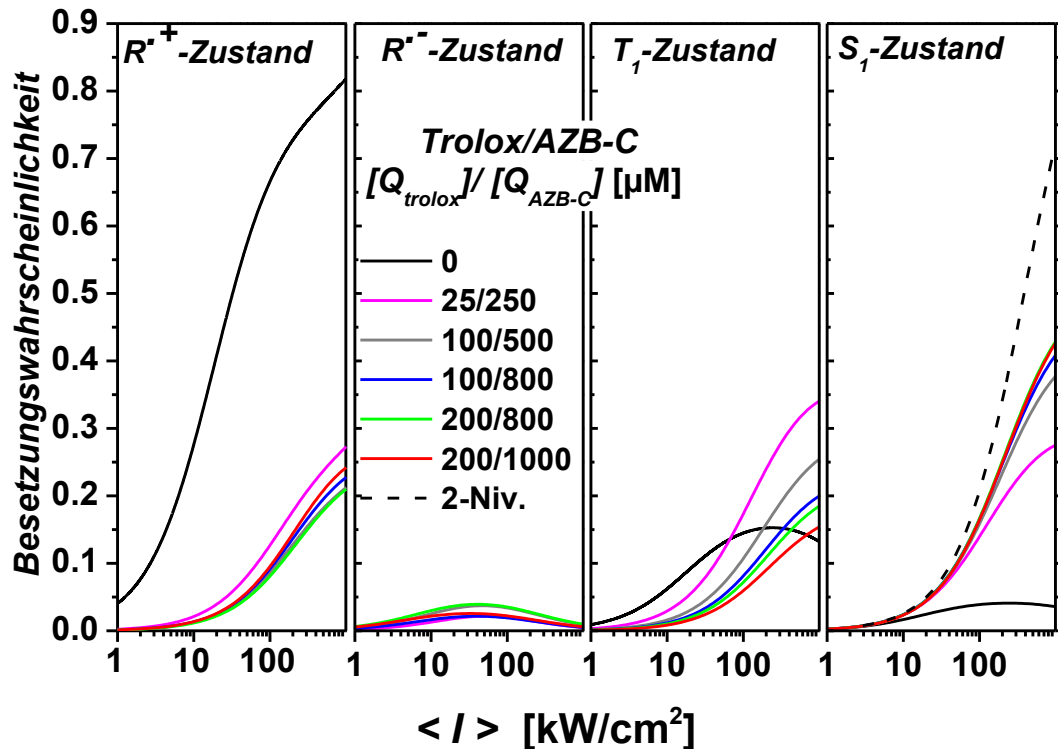


Abbildung 3.2-39 Besetzung der elektronischen Zustände des *Rh 110* in Gegenwart einer Mischung aus *Trolox* und *AZB-C*. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten wurden mit Hilfe des Modells 3a (Gleichungen 3.2-57-3.2-61 (Seite 121)) und der in Tabelle 3.2-14 (Seite 136) angegebenen Konstanten berechnet. Für die Austauschrate k_{diff} wurde ein konstanter Wert von $k_{diff} = 0$ verwendet. Die durch Farben Grau, Grün, Blau und Schwarz dargestellten, durchgezogenen Kurven repräsentieren die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen verwendeten Konzentrationen der Additive. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Verlauf der theoretisch maximal möglichen Besetzung des S_1 -Zustands bei einem hypothetischen 2-Niveaus (S_0 - S_1) System (Gleichung 3.2-45, Seite 103)

Aufgrund der Löschung des Radikalanionenzustands durch *AZB-C* und starken Löschung des Radikalkationenzustands durch *Trolox* steigt die Fluoreszenzzahlrate in Gegenwart von einer *Trolox/AZB-C*-Mischung deutlich stärker an als in Gegenwart von *Trolox* ohne *AZB-C* (Abbildung 3.2-35).

Trotz der vernachlässigbar kleinen Population des Radikalanions und einer im Vergleich zu allen anderen Additiven stärkeren Entvölkerung des Triplettzustands, kann aufgrund der nicht gegen null strebenden Population des Radikalkations bei

¹ Um die Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalanionenzustands in Gegenwart einer *Trolox/AZB-C*-Mischung nicht signifikant zu erhöhen ist in etwa ein Verhältnis der Konzentrationen der beiden Additive von $[Q]_{Trolox}/[Q]_{AZB-C} < 5/10$ notwendig (Abbildung 3.2-39)

steigenden Konzentration des *Trolox*, eine nicht so große Fluoreszenzzählratesteigerung in Gegenwart einer *Trolox/AZB-C*-Mischung wie in Gegenwart des *A-AZB-C* erreicht werden.

3.2.8.3 Das Verhältnis der Untergrundzählrate zur Fluoreszenzzählrate bei Verwendung der Additive

Im vorangegangenen Kapitel wurde die mögliche Fluoreszenzzählratensteigerung beim Ansatz von den Additiven betrachtet (Abbildung 3.2-35).

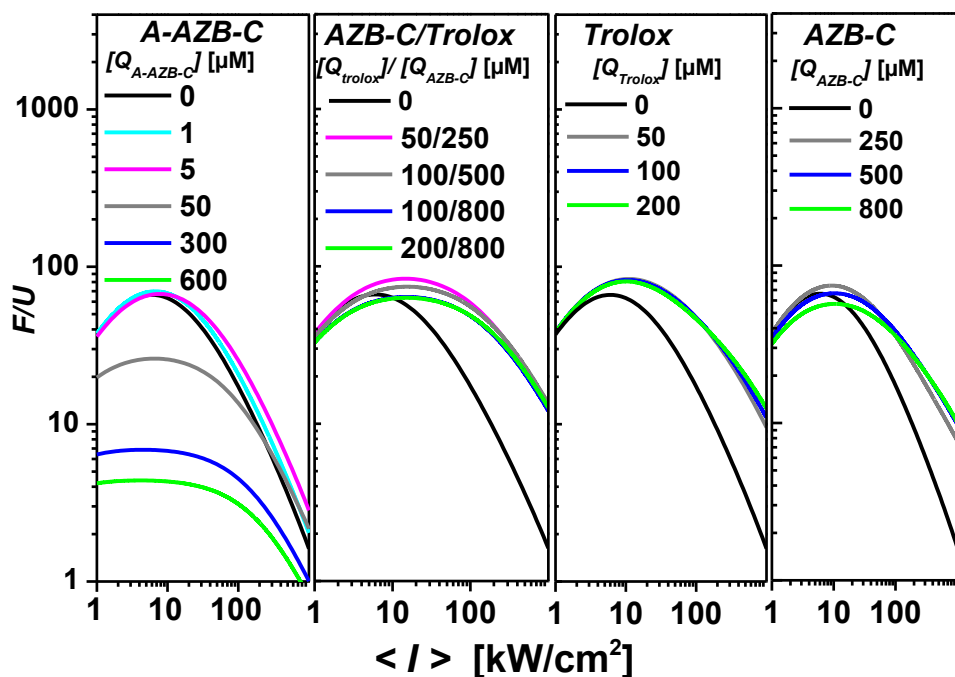


Abbildung 3.2-40 Das Verhältnis von der Fluoreszenzzählrate $F_{cpm(ideal)}$ zur Untergrundzählrate (F/U) bei *Rh 110* Messungen am Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) mit und ohne Additive im Leistungsdichtebereich von $\langle I \rangle = 1-1000 \text{ kW/cm}^2$. Die durch Farben Grau, Grün, Blau und Schwarz dargestellten, durchgezogenen Kurven repräsentieren die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen verwendeten Konzentrationen der Additive.

Sowohl bei allen, im Zusammenhang mit Fluoreszenz stehenden, bildgebenden Verfahren als auch bei *MFD*-Techniken ist neben der absoluten Fluoreszenzphotonenanzahl der Kontrast zwischen dem Fluoreszenzsignal und dem Signal des Untergrunds für die Messungen entscheidend. Deswegen wird nachfolgend das Verhältnis der Fluoreszenzzählrate zur Untergrundzählrate (Kapitel 3.2.3.4) F/U im Zusammenhang mit der Fluoreszenzzählratensteigerung des *Rh 110* bei der Verwendung der Additive betrachtet.

Das Verhältnis F/U des *Rh 110* ohne Additive im Phosphatpuffer am verwendeten Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) erreichte das Maximum mit $F/U_{Rh110(max)} = 66$. Die Anregungsleistungsdichte mit maximalen Verhältnis $F/U_{Rh110(max)}$ repräsentiert die bezüglich des F/U optimale Leistungsdichte $\langle I \rangle_{opt}$. Bei Messungen des *Rh 110* ohne Additive betrug die optimale Leistungsdichte $\langle I \rangle_{opt} = 6 \text{ kW/cm}^2$. Die Fluoreszenzzählrate bei der optimalen Anregungsleistungsdichte $\langle I \rangle_{opt}$ entspricht der Fluoreszenzzählrate $F_{cpm(opt)}$ mit dem maximalen F/U Verhältnis. Bei Messungen des *Rh 110* ohne Additive betrug die optimale Fluoreszenzzählrate $F_{cpm(opt)} = F_{cpm(ideal, bei \langle I \rangle = 6 \text{ kW/cm}^2)} = 55 \text{ kHz}$ (Abbildung 3.2-40, Abbildung 3.2-41). Aufgrund der Sättigung der Fluoreszenzzählrate bei gleichzeitig linear ansteigender Untergrundzählrate (Kapitel 3.2.3.4) sinkt F/U bei hohen Leistungsdichten, so dass im Bereich von $\langle I \rangle = 1 \text{ MW/cm}^2$ bereits $F/U = 2$ erreicht wird.

Allgemein kann die Wirkung eines Additivs als besonders vorteilhaft für eine Fluoreszenzmessung angesehen werden, wenn das Verhältnis F/U in Gegenwart des Additivs über dem Verhältnis $F/U_{Rh110(max)}$ steigt. Obwohl in Gegenwart des Additivs *A-AZB-C* die größte Fluoreszenzzählratensteigerung beobachtet werden konnte, bewirkt *A-AZB-C* aufgrund der sehr starken Eigenfluoreszenz (Kapitel 3.2.3.4) ab einer Konzentration von $[Q] > 5 \mu\text{M}$ eine Reduktion des F/U -Maximums. Dementsprechend fällt der maximale Anstieg des F/U -Maximums in Gegenwart des *A-AZB-C* sehr gering aus (Abbildung 3.2-41, Tabelle 3.2-15). Bei der Verwendung des Additivs *A-AZB-C* beträgt die Konzentration mit der größten Steigerung des F/U -Maximums $[Q]_{opt} = 1 \mu\text{M}$ ($[Q]_{opt}$ steht für die optimale Konzentration bezüglich des F/U). Der Anstieg des F/U -Maximums bei der Verwendung eines Additivs über dem $F/U_{Rh110(max)}$ erlaubt es, die Anregungsleistungsdichte zu erhöhen, ohne dass das Verhältnis F/U unterhalb des $F/U_{Rh110(max)}$ sinkt. Die maximale Anregungsleistungsdichte in Gegenwart des *A-AZB-C*, bei der das Verhältnis F/U größer oder gleich im Vergleich zum Verhältnis $F/U_{Rh110(max)}$ ist, beträgt $\langle I \rangle_{max} = 11 \text{ kW/cm}^2$ bzw. $F_{cpm(max)} = 60 \text{ kHz}$ (Abbildung 3.2-41).

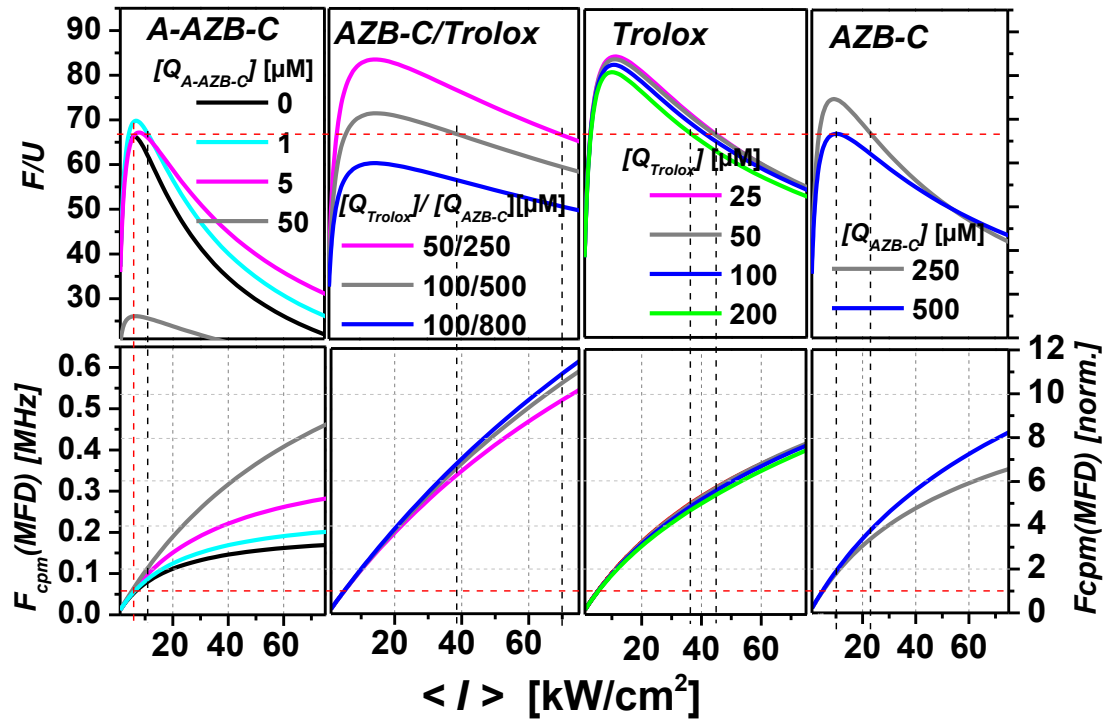


Abbildung 3.2-41 Das Verhältnis von der Fluoreszenzzählrate $F_{cpm(ideal)}$ zur Untergrundzählrate (F/U) zusammen mit $F_{cpm(ideal)}$ bei $Rh\ 110$ Messungen am Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) mit und ohne Additive. Die durch die Farben Grau, Grün, Blau und Schwarz dargestellten, durchgezogenen Kurven repräsentieren die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen verwendeten Konzentrationen der Additive¹.

Bei der Verwendung des Additivs *AZB-C* wurde bis zu einer Konzentration des Additivs von bis zu $[Q] = 250\ \mu\text{M}$ keine Erhöhung der Untergrundzählrate beobachtet (Kapitel 3.2.3.4). Dementsprechend wird ein optimaler Verhältnis F/U bei einer *AZB-C*-Konzentration von $[Q]_{opt} = 250\ \mu\text{M}$ erreicht. Die Verschiebung des Maximums des Verhältnisses F/U in Gegenwart des Additivs *AZB-C* erlaubt, es die Anregungsleistungsdichte zu vervierfachen und dadurch die Fluoreszenzzählrate zu verdreifachen, ohne dass das Verhältnis F/U im Vergleich zum Verhältnis $F/U_{Rh110(max)}$ niedriger wird (Abbildung 3.2-41, Tabelle 3.2-15).

¹ Die Untergrundzählraten bei den Konzentrationen des Additivs *A-AZB-C* von $[Q] = 5\ \mu\text{M}$ und $[Q] = 1\ \mu\text{M}$ wurden mittels einer Linearen Extrapolation aus den gemessenen Untergrundzählraten in Gegenwart des *A-AZB-C* abgeschätzt (Kapitel 3.2.3.4).

Tabelle 3.2-15 Vergleich der Fluoreszenzzählrate und des Verhältnisses der Fluoreszenzzählrate zur Untergrundzählrate F/U bei Messungen des *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM, pH 7) am Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) mit und ohne Additive. F/U_{max} steht für maximal mögliches F/U . $\langle I \rangle_{opt}$ und $[Q]_{opt}$ stehen für die, bezüglich des F/U , optimale Anregungsleistungsdichte bzw. Konzentration des Additivs. $F_{cpm(opt)}$ steht für die Fluoreszenzzählrate bei der $\langle I \rangle_{opt}$. $F_{cpm(max)}$ und $\langle I \rangle_{max}$ stehen für die maximale Fluoreszenzzählrate bzw. maximale Anregungsleistungsdichte in Gegenwart eines Additivs, bei denen das F/U noch höher Vergleich zum Verhältnis F/U_{max} des *Rh 110* ohne Additive ist.

	kein Additiv	Trolox/AZB-C	Trolox	AZB-C	A-AZB-C
$[Q]_{opt}$ [μM]	---	50/250	25	250	1
F/U_{max}	66	84	84	75	70
$\langle I \rangle_{opt}$ [kW/cm ²]	6	15	11	10	7
$\langle I \rangle_{max}$ [kW/cm ²]	---	70	45	23	11
$F_{cpm(opt)}$ [kHz]	55	155	110	95	60
$F_{cpm(max)}$ [kHz]	---	520	310	180	85

Die Verwendung des Additivs *Trolox* führte nicht zu einer Erhöhung der Untergrundzählrate (Kapitel 3.2.3.4). Dadurch kann in Gegenwart von *Trolox* im Vergleich zu den Additiven *AZB-C* und *A-AZB-C* eine deutlich stärkere Steigerung des Verhältnisses F/U beobachtet werden. Trotz konstant bleibender Untergrundzählrate wird das Optimum des Verhältnisses F/U in Gegenwart von *Trolox* bei einer Konzentration von $[Q]_{opt} = 25 \mu M$ erreicht (Abbildung 3.2-41). Ab einer *Trolox*-Konzentration von $[Q] > 50 \mu M$ wird ein sinkendes F/U beobachtet (Abbildung 3.2-41). Der Grund dafür ist die zusätzlichen Besetzung des Radikalanionzustands und die damit verbundenen Abnahme der Fluoreszenzzählrate des *Rh 110* bei niedrigen Anregungsleistungen (Kapitel 3.2.8.2). Die höchste Anregungsleistungsdichte, bei der das Verhältnis F/U noch dem Verhältnis $F/U_{Rh110(max)}$ entspricht, betrug bei *Trolox* $\langle I \rangle = 45 \text{ kW/cm}^2$, wobei die Fluoreszenzzählrate hier den Wert von $F_{cpm(max)} = 310 \text{ kHz}$ erreicht, was in etwa einer Verfunffachung der Fluoreszenzzählrate im Vergleich zu der Fluoreszenzzählrate beim *Rh 110* ohne Additive entspricht (Abbildung 3.2-41, Tabelle 3.2-15).

Bei der Verwendung der *Trolox/AZB-C*-Mischung addieren sich die Einflüsse der beiden Additive, was zum optimalen Konzentrationsverhältnis der Mischung von

$[Q]_{opt} = 50/250 \text{ } \mu\text{M}$ ($[Q]_{Trolox} = 50 \text{ } \mu\text{M}$, $[Q]_{AZB-C} = 250 \text{ } \mu\text{M}$) führt. Die höchste Anregungsleistungsdichte bei der das Verhältnis F/U noch dem Verhältnis $F/U_{Rh110(max)}$ betrug dabei $\langle I \rangle_{max} = 70 \text{ kW/cm}^2$. Damit kann in Gegenwart von Trolox/AZB-C-Mischung beim im Vergleich zum $F/U_{Rh110(max)}$ gleichen Verhältnis F/U eine Fluoreszenzzählrate von $F_{cpm(max)} = 520 \text{ kHz}$ erreicht werden, was mehr als neunfachen Fluoreszenzzählrate im Vergleich zu der Fluoreszenzzählrate des *Rh 110* ohne Additive entspricht (Abbildung 3.2-41, Tabelle 3.2-15).

3.2.8.4 Die Strategie zur Optimierung der Fluoreszenzzählrate

Im Zusammenhang mit den im Kapitel 3.2.8.2 präsentierten Ergebnissen, muss die in der Referenz [64] (siehe auch Kapitel 3.2.2 Abbildung 3.2-2) vorgeschlagene Strategie¹ zur Optimierung des Fluoreszenzsignals des *Rh 123*, neu diskutiert werden.

Aufgrund der dominierenden Besetzung des Radikalkationzustands im Vergleich zu allen anderen Zuständen kann die vorgeschlagene ausschließliche Löschung des Triplettzustands bei gleichzeitiger Vermeidung aller Elektronentransferreaktionen in luftgesättigter wässriger Lösung nur vergleichsweise geringen Einfluss auf die Fluoreszenzzählrate haben. Um die Fluoreszenzzählrate der *Rhodamine* in luftgesättigter wässriger Lösung zu optimieren, muss das entsprechende Additiv in der Lage sein sowohl den Triplettzustand mittels eines Triplett-Triplett-Energietransfers als auch den Radikalkationzustand mittels einer Elektronentransferreaktion zu entvölkern. Gleichzeitig ist beim *Rh 110* der energetische Abstand zwischen dem S_1 - bzw. T_1 -Zustand und dem R_1^{*+} -Zustand größer im Vergleich zum energetischen Abstand zwischen dem $R_1^{\bullet}$ -Zustand und dem S_0 -Zustand (siehe Tabelle 3.2-16, vergleiche Rehm-Weller-Gleichung Gleichung 1.1-13 (Seite 11) und entsprechende Werte in Tabelle 3.2-5 (Seite 66))). Aus diesem Grund wird bei jedem Additiv, bei dem die Reduktion des Radikalzustands des *Rh 110* thermodynamisch erlaubt ist, auch zwangsläufig die Reduktion des S_1 - bzw. T_1 -Zustands thermodynamisch erlaubt sein. Daher muss bei

¹ Bei dieser Strategie wird ein Additiv anhand von thermodynamischen Kriterien so ausgewählt, dass die Löschung des Triplettzustands mittels eines Triplett-Triplett-Energietransfers möglich ist, während die Elektronentransferreaktionen zwischen Singulett- bzw. Triplettzustand und dem Additiv nicht erlaubt sind

der Auswahl der Additive die thermodynamisch erlaubte Reduktion des S_I - bzw. T_I -Zustands im Kauf genommen werden. Dementsprechend lassen sich die Kriterien bei der Auswahl eines Additivs für die Optimierung des Fluoreszenzsignals des *Rh 110*¹ in luftgesättigter wässriger Lösung in kinetische und thermodynamische Kriterien unterteilen. Zu den thermodynamischen Kriterien zählen die Fähigkeiten sowohl die Energie des Triplettzustands aufzunehmen als auch den Radikalkationenzustand zu reduzieren. Bei dem kinetischen Kriterium handelt es sich um die Bedingung, dass die Summe der additivabhängigen Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion des S_I - und des T_I -Zustands deutlich kleiner sein muss als die Sauerstoff abhängige Geschwindigkeitskonstante für Löschung des $R_I^{\bullet}$ -Zustand von $k_{qoxR}^* = 6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kapitel 3.2.2 Fußnote auf Seite 56).

Tabelle 3.2-16 Der mit Hilfe in Tabelle 3.2-5 (Seite 66) eingetragenen Werte berechneter energetischer Abstand zwischen den elektronischen Zuständen des *Rh 110* Bei der Oxidation des R_I^{++} -Zustands ist der energetische Abstand zwischen den Zuständen R_I^{++} und S_0 größer als der energetische Abstand zwischen den Zuständen $R_I^{\bullet}$ und S_I bzw. $R_I^{\bullet}$ und T_I . D.h. der S_I - bzw. T_I -Zustand ist ein stärkeres Reduktionsmittel als R_I^{++} -Zustand. Beim $R_I^{\bullet}$ -Zustand gilt, nach ähnlichen Gesichtspunkten, dass der S_I - bzw. T_I -Zustand ebenfalls stärkeres Oxidationsmittel als $R_I^{\bullet}$ -Zustand ist. Blau markiert sind die „gewünschten“ Übergänge bei der Reduktion bzw. Oxidation der Radikalzustände des *Rh 110*. Rot Markiert sind die „nicht gewünschte“ Übergänge, die aufgrund deren energetischen Lage zwangsläufig bei der bei der Reduktion bzw. Oxidation der Radikalzustände stattfinden müssen.

	Reduktion des R_I^{++} -Zustands			Oxidation des $R_I^{\bullet}$ -Zustands		
	$S_I-R_I^{\bullet}$	$T_I-R_I^{\bullet}$	$R_I^{++}-S_0$	$S_I-R_I^{++}$	$T_I-R_I^{++}$	$R_I^{\bullet}-S_0$
$\Delta E [\text{eV}]$	1.84	1.33	1.29	1.16	0.65	0.61

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Additiven entsprach das Additiv *A-AZB-C* diesen Kriterien. Entsprechend konnte in Gegenwart dieses Additivs die größte Steigerung der Fluoreszenzzahlrate bei *Rh 110* (oder *Rh 123* [24]) beobachtet werden.

Bei Messungen unter sauerstofffreien Bedingungen wird der $R_I^{\bullet}$ -Zustand nicht mehr durch den Sauerstoff gelöscht. Daher wird ein weiteres Additiv, der den $R_I^{\bullet}$ -Zustand löschen kann benötigt. Zu beachten ist, dass wie bei der Reduktion des R_I^{++} -Zustands, bei der Oxidation des $R_I^{\bullet}$ -Zustands, zwangsläufig die Oxidation des S_I - bzw. T_I -Zustand thermodynamisch erlaubt sein wird. Der Grund hierfür ist, der größere energetische Abstand zwischen dem S_I - bzw. T_I -Zustand und dem

¹ Die gilt auch für andere dem *Rh 110* ähnliche Rhodamine (wie z.B. *Rh 123* oder Alexa 488).

$R_I^{\bullet-}$ -Zustands im Vergleich zum energetischen Abstand zwischen dem $R_I^{\bullet+}$ -Zustand und dem S_0 -Zustand (siehe Tabelle 3.2-16).

D. h. bei *Rh 110* die Löschung des Radikalkations durch einen Additiv gleichzeitig die Bildung des Radikalanions und umgekehrt die Löschung des Radikalanions die Bildung des Radikalkations zur Folge haben wird. Daher kann bei der Löschung der beiden Radikalzuständen mit zwei Additiven nur dann eine große Fluoreszenzsignalsteigerung erreicht werden, wenn die Summen der additivabhängigen Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion bzw. die Oxidation des S_I - und des T_I -Zustands deutlich kleiner sind als die Summen der additivabhängigen Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation des Radikalanionzustands bzw. für die Reduktion des Radikalkationzustands.

In Bezug auf die Löschung des S_I -Zustands durch die Additive ist es wichtig, dass bei einer Konzentration der Additive von $[Q] \leq 1$ mM die Stoßrate zwischen den potenziellen Reaktionspartnern (Fluorophor und Additiv) deutlich kleiner ist als die Relaxationsrate des S_I -Zustands von $k_0 = 2.5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (Kapitel 3.2.3.6 Kapitel 1.1.2). Dies führt dazu, dass die Additive trotz diffusionskontrollierte Löschung des S_I -Zustands für die Optimierung der Fluoreszenzzählrate eingesetzt werden können.

Bei einer kovalenten Verknüpfung der Additive mit einem Fluorophor kann die Geschwindigkeit der Löschung des S_I -Zustands nicht mehr über die Konzentration des Additivs kontrolliert werden. Im Allgemeinen wird dadurch die Löschung des S_I -Zustands zu einer nicht zu vernachlässigbaren Minderung der Fluoreszenzzählrate führen. In diesem Zusammenhang muss das für die kovalente Verknüpfung vorgesehene Additiv die in der Referenz [64] vorgeschlagenen Kriterien erfüllen. Die notwendige Löschung der Radikalzustände muss in diesem Fall durch Zugabe von weiteren Additiven erfolgen.

3.2.9 Auswertung der Messungen der Photozerstörung von Rhodamin 123

3.2.9.1 Das kinetische Modell der Photozerstörung bei niedrigen Leistungsdichten

Die Photozerstörungsexperimente wurden bei einer Leistungsdichte von $\langle I \rangle = 14 \text{ W/cm}^2$ durchgeführt. Bei solchen Leistungsdichten können die Besetzungswahrscheinlichkeiten aller höher angeregten Zustände vernachlässigt werden. Damit kann die gesamte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung eines Fluorophors mit Hilfe Besetzungswahrscheinlichkeiten der verbliebenen Zustände mittels Gleichung 3.2-74 beschrieben werden.

$$k_{b(fl)} = R_{1eq}^{\bullet+} \cdot k_{bR1+} + T_{1eq} \cdot k_{bT1} + S_{1eq} \cdot k_{bS1} \quad 3.2-74$$

$k_{b(fl)}$ = Summierte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung

Bei der Betrachtung der Besetzungswahrscheinlichkeiten der Radikalkation-, Triplet- und Singulettzustände der Triplet- und der Singulettzustand, aufgrund deren im Vergleich zum Radikalkationzustand sehr schnellen Kinetik, zu einem einzigen Zustand zusammengefasst werden (vergl. Kapitel 3.2.4.1). Dementsprechend kann das kinetische Modell für die Photozerstörungsmessungen mit dem in der Abbildung 3.2-42 abgebildetem Schema (*Modell 4*) beschrieben werden. Damit können bei sehr niedrigen Leistungsdichten (weit entfernt von der Sättigung der Besetzung der elektronischen Zustände) die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Triplet- und Radikalzustände mit Hilfe der Gleichungen 3.2-75 und 3.2-76 ausgedrückt werden.

$$R_{1eq}^{\bullet+} \approx S_{1eq} \cdot \frac{k_{ox tot}}{k_{red tot}} \quad 3.2-75$$

$$T_{1eq} \approx S_{1eq} \cdot \frac{k_{ISC}}{k_T'} \quad 3.2-76$$

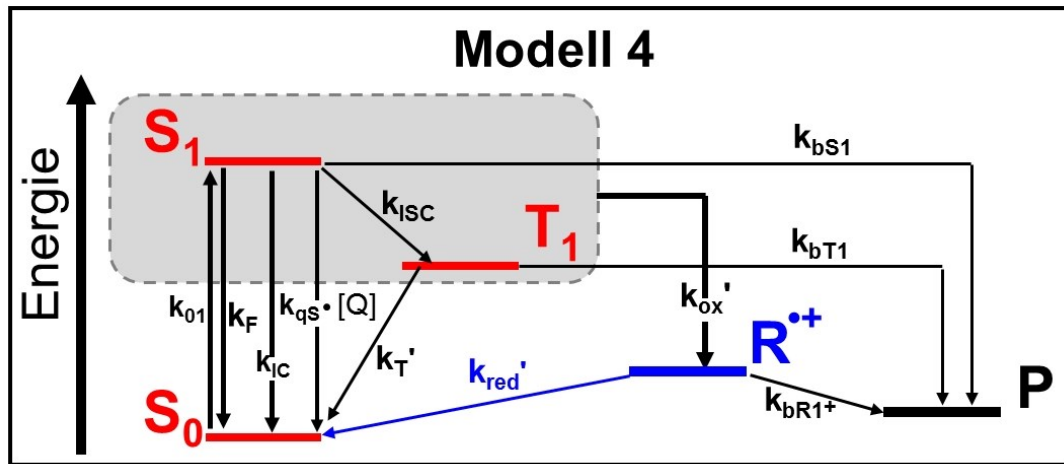


Abbildung 3.2-42 Schema für ein kinetisches Modell der Photozerstörung bei niedrigen Leistungsdichten. Der Zustand P , der alle möglichen irreversiblen Produkte einer Photozerstörungsreaktion repräsentiert, kann aus allen angeregten Zuständen (Gleichung 3.2-78) erreicht werden.

Die summierte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung könnte damit durch die Gleichung 3.2-77 beschrieben werden.

$$k_{b(fl)} = \left[\frac{k_{ox}'}{k_{red}'} \cdot k_{bR1+}' + \frac{k_{ISC}}{k_T'} \cdot k_{bT1}' + k_{bS1}' \right] \cdot S_{1eq} \quad 3.2-77$$

Wird die Geschwindigkeit der Photozerstörung eines Fluorophors nach der Absorption eines Photons betrachtet so kann Gleichung 3.2-77 auf S_{1eq} normiert werden, was zur Gleichung 3.2-78 führt.

$$k_{btot}' = \left[\frac{k_{ox}'}{k_{red}'} \cdot k_{bR1+}' + \frac{k_{ISC}}{k_T'} \cdot k_{bT1}' + k_{bS1}' \right] \quad 3.2-78$$

k_{btot}' = Gesamte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung bezogen auf einen angeregten Fluorophor

Das formale Wegfallen der Besetzungswahrscheinlichkeiten in Gleichung 3.2-78 führt dazu, dass die eventuell auftretende Löschung des Singulettzustands durch die Additive nicht mehr berücksichtigt werden kann. Die zusätzliche Berücksichtigung der Löschung des Singulettzustands führt zur Gleichung 3.2-79 (Siehe Kapitel 5.3 [24]¹).

$$k_{btot}' = \left[\frac{k_{ox}'}{k_{red}'} \cdot k_{bRI+}' + \frac{k_{ISC}}{k_T'} \cdot k_{bTI+}' + k_{bSI}' \right] \cdot \frac{k_F + k_{IC}}{k_F + k_{IC} + k_{qS} \cdot [Q]} \quad 3.2-79$$

Da die Singulettlöschung bei den Konzentrationen der Additive ($[Q] \leq 1$ mM), die in dieser Arbeit eingesetzt werden vernachlässigbar ist (vergleiche Kapitel 3.2.3.6), wird für die Auswertung der Photozerstörungsexperimente Gleichung 3.2-78 eingesetzt.

Zu beachten ist, dass im Vergleich zu den in vorherigen Kapiteln beschriebenen Messungen von *Rh 110*, die an einer konfokalen Messordnung durchgeführt wurden, muss bei den Messungen am *Fluoreszenzaufbau für Photozerstörung* (Kapitel 3.2.3.16) keine Austauschrate mit der Fluorophore in das bestrahlte Volumen hinein bzw. heraus diffundieren berücksichtigt werden.

¹ In der angegebenen Referenz wird die Gleichung 3.2-79 ohne den Radikalterm angegeben. Als Begründung dafür wird die vernachlässigbar kleine Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalkationenzustands bei der eingesetzten Leistungsdichte von $\langle I \rangle = 14$ W/cm² angeführt. Diese Begründung ist falsch. Ohne (bzw. bei kleinen Konzentrationen) der Radikal löschenden Additive ist die Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalkationenzustands grundsätzlich größer als die Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplet- bzw. des Singulettzustands (vergleiche Gleichung 3.2-77), weil das Verhältnis k_{ox}'/k_{redot}' größer als 1 und gleichzeitig größer als das Verhältnis k_{ISC}/k_T' ist (siehe *Tabelle 3.2-14*).

3.2.9.2 Photozerstörung von Rh 123 in Gegenwart von Sauerstoff

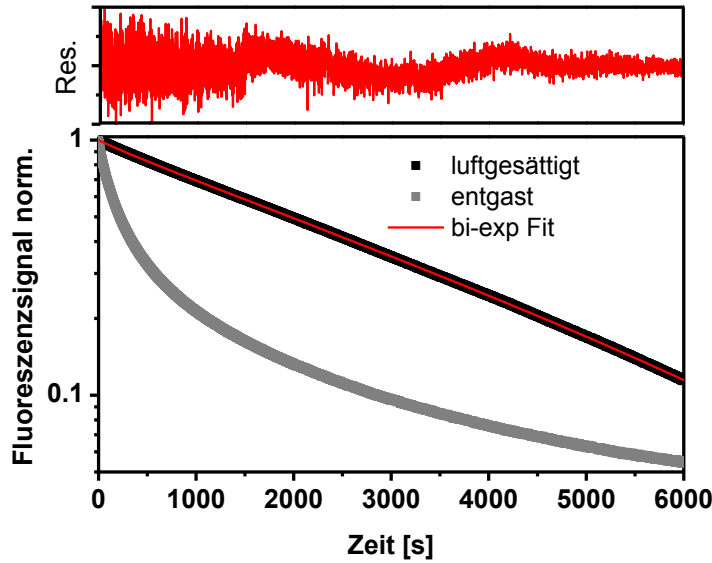


Abbildung 3.2-43 Abnahme des Fluoreszenzsignals des *Rh 123* (100 nM) in 0.7 mL luftgesättigtem (schwarz) und sauerstofffreiem Phosphatpuffer (grau) mit einer Konzentration von $c = 25$ mM bei pH 7. Bei Messung in luftgesättigtem Puffer (Sauerstoffkonzentration $c_{O_2} \approx 290 \mu\text{M}$ [24]) konnten die Daten an eine biexponentielle Funktion (Gleichung 3.2-80) angepasst werden.

In luftgesättigtem Phosphatpuffer konnte die Fluoreszenzsignalabnahme des *Rh 123* an eine biexponentielle Funktion (Gleichung 3.2-80) mit den Amplituden $A_1 = 0.89$, $A_2 = 0.11$ und den Konstanten $k_1 = 0.57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1.7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ angepasst werden (siehe Abbildung 3.2-43).

$$F(t) = A_1 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + A_2 \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad 3.2-80$$

Dabei wurde die Komponente mit der Konstante $k_1 = 0.57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ der Abnahme der Konzentration des *Rh 123* aufgrund der Photozerstörung zugeordnet (siehe Kapitel 3.2.3.18) [28, 65].

Damit entspricht k_1 der im Kapitel 1.2 beschriebenen vom Lösungsmittelvolumen abhängigen makroskopischen Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung k_z (Gleichung 1.2-3). Mit Gleichung 1.2-5 lässt sich aus k_z die Quantenausbeute der Photozerstörung Φ_b bestimmen. Mit $\sigma_{01} \cdot \gamma = 645 \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $V = 0.7 \text{ mL}$, $b_c = 1 \text{ cm}$, $P = 1.06 \text{ W}$ ist $\Phi_b = 6 \cdot 10^{-7}$. Die mikroskopische Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung k_b ist über Gleichung 1.2-4 mit Φ_b verknüpft. Bei einer Fluoreszenzlebensdauer des *Rh 123* von $\tau_0 = 4 \text{ ns}$ ist $k_{btot} = 150 \text{ s}^{-1}$.

In Gegenwart der beiden Additive *A-AZB-C* und *AZB-C* wurde eine Abnahme von k_b beobachtet. Die Auftragung der k_b -Werte gegen die entsprechenden Konzentrationen der Additive in luftgesättigtem Phosphatpuffer sind in Abbildung 3.2-44 zu finden.

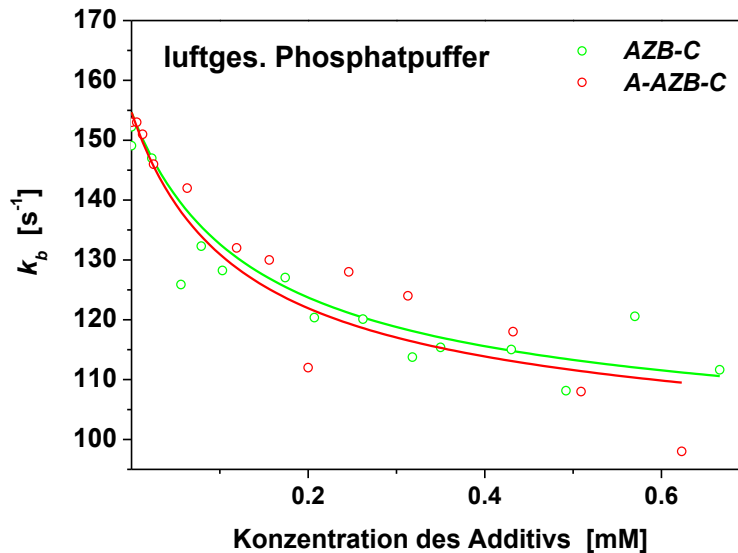


Abbildung 3.2-44 Änderung der Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung von *Rh 123* (100 nM) in Abhängigkeit von der Konzentration der Additive in luftgesättigtem Phosphatpuffer (25 mM pH 7) [24].

Eine globale Anpassung der gegen die Konzentration der Additive aufgetragenen k_b -Werte an Gleichung 3.2-79 (Seite 154) liefert die *Rh 123*-spezifischen Konstanten für die Photozerstörung aus den elektronischen Zuständen S_1 und T_1 $k_{bS} = 107 \text{ s}^{-1}$ und $k_{bT} = 27 \text{ s}^{-1}$. Die für diese Anpassung nötigen Werte der Geschwindigkeitskonstanten des *Rh 123* sind in Tabelle 5.4-1 (Seite 215) zusammengefasst¹.

3.2.9.3 Messungen der Photozerstörung unter sauerstofffreien Bedingungen

Die Messungen mit sauerstofffreiem Phosphatpuffer (Kapitel 3.2.3.18) zeigten einen deutlich komplexeren Verlauf der Signalabnahme im Vergleich zu Messungen mit luftgesättigten Lösungen (siehe Abbildung 3.2-43). Der Verlauf der

¹ Bei der Anpassung von Gleichung 3.2-79 an die k_b -Werte wurde für die Konstante k_{bR^+} ein Wert von $k_{bR^+} \approx 0 \text{ s}^{-1}$ angenommen, da beide Additive *A-AZB-C* und *AZB-C* einen ähnlichen Einfluss auf den k_b -Wert von *Rh 123* haben, obwohl das Additiv *A-AZB-C* im Vergleich zum Additiv *AZB-C* deutlich stärker den Radikalkationenzustand von *Rh 123* depopuliert. Aus dem gleichen Grund wurden die Werte der additivkonzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten k_{qbR^+} , k_{qbT} und k_{qbS} als vernachlässigbar klein angenommen (k_{qbR^+} , k_{qbT} , $k_{qbS} \approx 0 \text{ s}^{-1}$).

Fluoreszenzsignalabnahme zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Anfangskonzentration des *Rh 123* und von den im Verlauf der Messung entstandenen Produkten der Photozerstörung. Weil das Ziel dieser Arbeit in der Optimierung des Fluoreszenzsignals hauptsächlich für Einzelmolekülmessungen bestand, bei denen die eingesetzten kleinen Konzentrationen der Farbstoffe ($c \approx 10$ pM) nur unimolekulare (bezüglich des Farbstoffes) Photozerstörungsreaktionen zulassen, wurde auf die Untersuchung der nicht unimolekularen Reaktionen des *Rh 123* im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Um die unimolekulare Photozerstörungsgeschwindigkeitskonstante aus der Abnahme des Fluoreszenzsignals von *Rh 123* in sauerstofffreiem Phosphatpuffer zu erhalten, wurden Photozerstörungsmessungen bei verschiedenen Konzentrationen des *Rh 123* durchgeführt. Um den Einfluss von reaktiven Produkten der Photozerstörungsreaktion zu minimieren, wurden kleine Anfangskonzentrationen des *Rh 123* ($c_{Rh\ 123} = 1\text{-}30$ nM) verwendet.

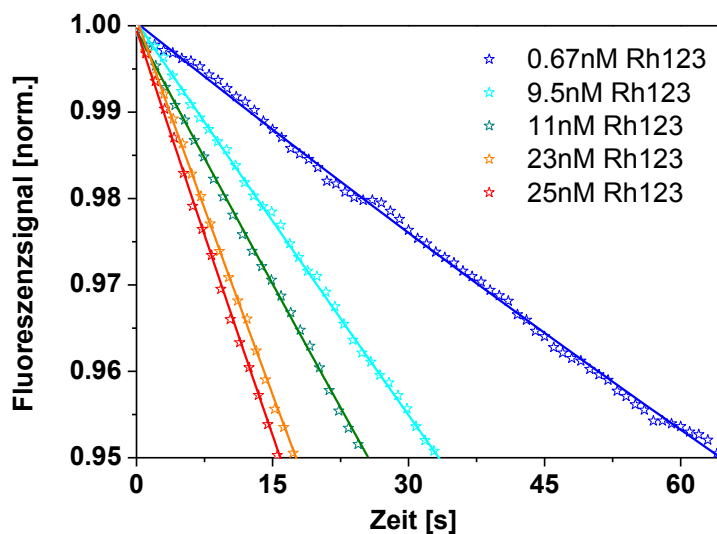


Abbildung 3.2-45 Verlauf der Fluoreszenzsignalabnahme bei verschiedenen Konzentrationen (Sterne) von *Rh 123* im mit Argon (30 min) gespülten Phosphatpuffer (25 mM pH 7). Die Linien repräsentieren lineare Anpassungen an die ersten 5 % der gemessenen Daten (siehe Text).

Zusätzlich wurde für die Auswertung der Fluoreszenzabnahme nur der Bereich der Fluoreszenzabnahmekurven in dem die Konzentration der reaktiven Produkte eine vernachlässigbar kleine Rolle spielt (die ersten 5%) verwendet (siehe Abbildung 3.2-45). Die Steigung dieser Kurven zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration des *Rh 123* und entspricht der Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung (k_{zbm}), bei der sowohl die unimolekulare als auch die bimolekulare

Photozerstörungsreaktion eine Rolle spielen. Der y-Achsenabschnitt der linearen Anpassung an die Auftragung von k_{zbm} gegen die *Rh 123*-Konzentration (Abbildung 3.2-46) liefert die interpolierte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung für $c_{Rh\ 123} \rightarrow 0$ M. Dabei entspricht diese interpolierte Geschwindigkeitskonstante der unimolekularen makroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung k_z (siehe Kapitel 1.2, Gleichung 1.2-3).

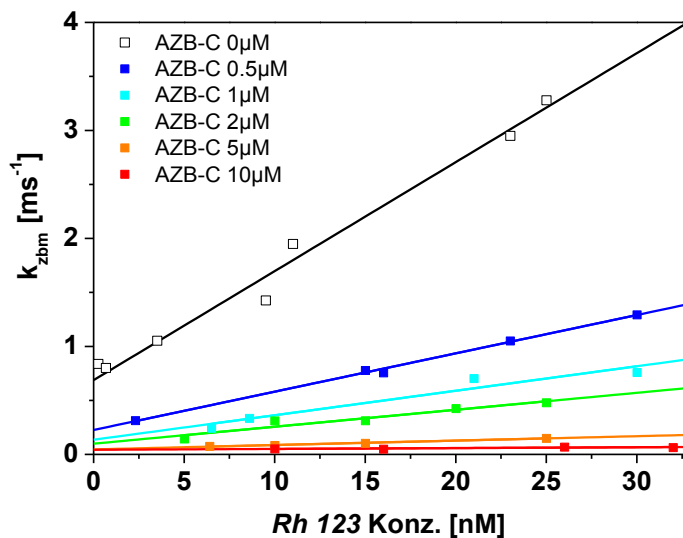


Abbildung 3.2-46 Auftragung der Geschwindigkeit der Photozerstörung k_{zbm} (Steigungen der ersten 5 % der Fluoreszenzsignalabnahmekurven vergleiche Abbildung 3.2-45) gegen *Rh 123* Konzentration zur Bestimmung der unimolekularen Geschwindigkeitskonstanten k_z (y-Achsenabschnitt der linearen Anpassung) für verschiedene Konzentrationen des Additivs *AZB-C*.

In Gegenwart kleiner Konzentrationen des Additivs *AZB-C* wurde eine ähnliche Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{zbm} von der *Rh 123*-Konzentration beobachtet (Abbildung 3.2-46). Allerdings verringerte sich diese Abhängigkeit mit steigender Konzentration des Additivs, so dass ab einer Additivkonzentration von $c_{AZB-C} = 20 \mu\text{M}$ eine Messung mit einer *Rh 123* Konzentration von $c_{Rh\ 123} = 100$ nM ausreichend war, um die Geschwindigkeitskonstante k_z zu bestimmen.

Analog zur Auswertung der Messungen von *Rh 123* in luftgesättigtem Phosphatpuffer (Kapitel 3.2.9.1) kann aus k_z die mikroskopische Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung k_{btot} bestimmt werden. Die Anpassung von Gleichung 3.2-79 (Seite 154) an die Auftragung von k_{btot} gegen die entsprechende *AZB-C*-Konzentration (Abbildung 3.2-47) liefert die für *Rh 123*

spezifischen Konstanten für die Photozerstörung aus den elektronischen Zuständen S_I und T_I unter sauerstofffreien Bedingungen $k_{bS_{deox}} < 7 \text{ s}^{-1}$ und $k_{bT_{deox}} = 3 \text{ s}^{-1}$. (Die bei der globalen Anpassung von Gleichung 3.2-79 festgehaltenen Parameter sind im Kapitel 5.1 in Tabelle 5.4-1 zusammengefasst).

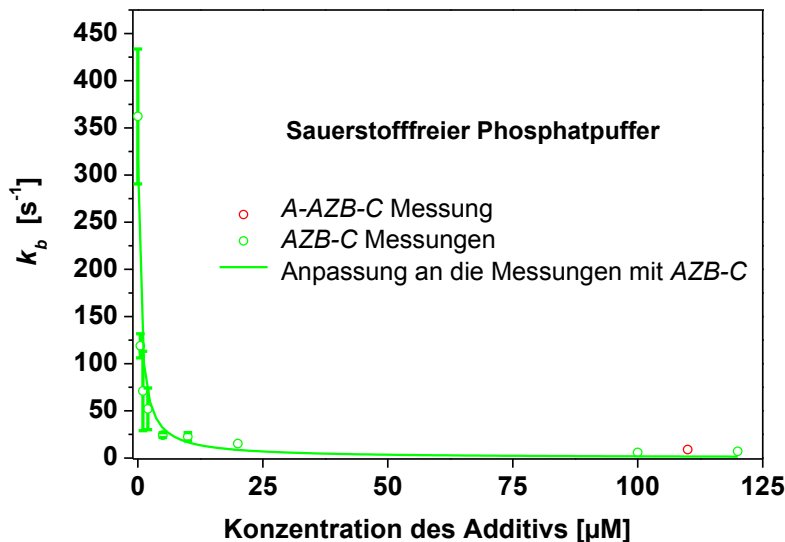


Abbildung 3.2-47 Änderung der Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung k_b von *Rh 123* in Abhängigkeit von der Konzentration des *AZB-C* in sauerstofffreiem Phosphatpuffer (25 mM pH 7). Die grüne Linie zeigt die Anpassung von Gleichung 3.2-79 an die Daten. Die Fehlerbalken resultieren aus der Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Konstante k_z (Standardfehler der y-Achsenabschnitte in Abbildung 3.2-46)

3.2.9.4 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Photozerstörung des *Rh 123* bei niedrigen Anregungsleistungen wurde bei den Additiven *A-AZB-C* und *AZB-C* die gleiche Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung (k_b) von der Additivkonzentration beobachtet (Abbildung 3.2-44 und Abbildung 3.2-47), obwohl das Additiv *A-AZB-C* deutlich stärker den Radikalkationenzustand des *Rh 123* entvölkern kann (vergleiche Geschwindigkeitskonstante k_{qR^+}). Daraus folgt, dass der Radikalkationenzustand bei niedrigen Leistungsdichten eine vernachlässigbar kleine Rolle bei der Photozerstörung des *Rh 123* spielt, was mit der Ergebnissen der *FCS*-Messungen des *Rh 123* [24] übereinstimmt, bei denen lediglich eine kleine Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation des Fluorophors zum Radikalkation zusammen mit vernachlässigbar kleiner Geschwindigkeitskonstante für

Photozerstörung ($k_{bR+tot} < 10^3 \text{ s}^{-1}$) gefunden wurden. Zusätzlich zeigten die Photozerstörungsmessungen, dass im luftgesättigten Puffer der S_I -Zustand im Vergleich zum T_I -Zustand deutlich stärker in die Photozerstörung involviert ist ($k_{bS}/k_{bT} \approx 4$). Deswegen wurde nur eine schwache Wirkung der Additive auf die Photostabilität des *Rh 123* in Gegenwart von Sauerstoff beobachtet. Bei einer Konzentration der Additive *A-AZB-C* oder *AZB-C* von $c > 100 \mu\text{M}$ ist die Photostabilität um etwa 30 % gestiegen (Änderung der Geschwindigkeitskonstante k_b siehe Abbildung 3.2-44).

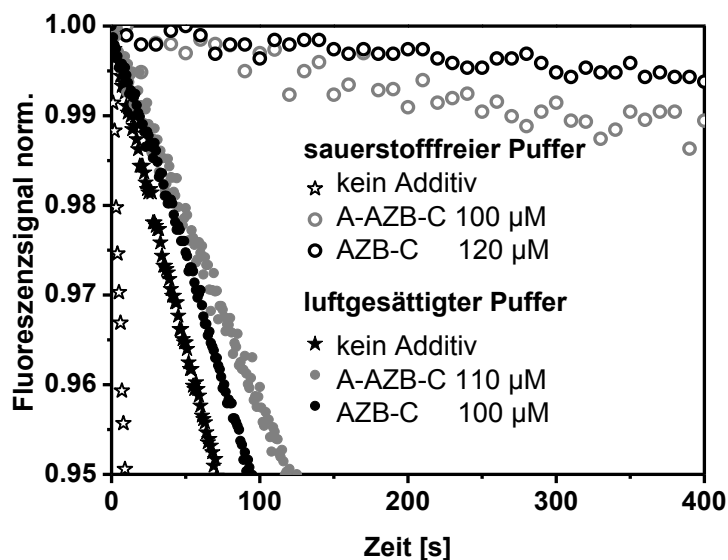


Abbildung 3.2-48 Vergleich der Photozerstörungsgeschwindigkeit von *Rh 123* (100 nM) mit und ohne Additive, sowohl in luftgesättigtem als auch in mit Argon (30 min) gespültem Phosphatpuffer (25 mM pH 7). Die Messungen wurden am Küvettenaufbau bei einer Laserleistung von $P = 1 \text{ W}$ und einer Wellenlänge von $\lambda = 496.5 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Volumina betrugen für die Messungen im luftgesättigten Puffer und im sauerstofffreien Puffer $V = 0.7 \text{ mL}$ bzw. $V = 1.3 \text{ mL}$.)

Unter sauerstofffreien Bedingungen ist die Population des T_I -Zustands etwa 35 mal höher ($k_{ISC}/k_T = 1.8$ im luftgesättigten Puffer (Tabelle 5.4-1) im Vergleich zu $k_{ISC}/k_T = 63$ unter sauerstofffreien Bedingungen [64]). Dadurch führt bereits ein niedriger Wert für die Konstante der Photozerstörung aus dem Triplettzustand ($k_{bT} = 3 \text{ s}^{-1}$) zu einer beschleunigten Photozerstörung des *Rh 123*, wenn kein Additiv dazugegeben wurde ($k_{bTot} \approx 360 \text{ s}^{-1}$). Gleichzeitig führt die Anwesenheit von geringen Konzentrationen eines triplettlöschenden Additivs ($c \approx 20\text{--}100 \mu\text{M}$) zu einer starken Verlangsamung der Photozerstörung (siehe Abbildung 3.2-47 und Abbildung 3.2-48). Bei einer Konzentration des Additivs *AZB-C* von $c = 100 \mu\text{M}$ wurde unter sauerstofffreien Bedingungen die Geschwindigkeitskonstante der

Photozerstörung von $k_{blot} = 6 \text{ s}^{-1}$ beobachtet (siehe Abbildung 3.2-47), was einer 60-fachen Steigerung der Photostabilität entspricht. Ein Vergleich zwischen den Messungen im luftgesättigten und sauerstofffreien Puffer mit einer Additivkonzentration (*A-AZB-C* oder *AZB-C*) von $[Q] \approx 100 \text{ } \mu\text{M}$ ergibt eine mindestens 10-fach größere Photostabilität bei sauerstofffreien Bedingungen.

3.2.9.5 Der Einfluss der Photozerstörung auf die Fluoreszenzmessungen

Die Photozerstörung konnte bei allen *FCS*-Messungen in der Form von Abnahme der Fluoreszenzintensität bzw. in Form der langsamen Abnahme der Fluorophorkonzentration während einer Leistungsdichte-Messreihe beobachtet werden.

Die Auswertung der Abnahme der Konzentration der Fluorophore, aufgrund der Photozerstörung, erfordert die Kenntnisse der exakten Geometrie des bestrahlten Volumenelements (Siehe Kapitel 1.2) und der Transporteigenschaften des Fluorophors. Gleichzeitig kann bei den Messungen mit offenen konfokalen Volumen und frei diffundierenden Fluorophoren speziell bei auftretender Sättigung der Besetzung der elektronischen Zustände die Geometrie des Detektionsvolumens nicht genau bestimmt werden (siehe Kapitel 1.2, Kapitel 2.4.2). Deswegen konnte die Änderung des Fluoreszenzsignals am konfokalen Aufbau nicht für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung verwendet werden. Stattdessen werden für die Diskussion die entsprechenden bereits bekannten Geschwindigkeitskonstanten des *Rh 123* verwendet¹ ($k_{bSI} = 107 \text{ s}^{-1}$ und $k_{bTI} = 27 \text{ s}^{-1}$ $k_{bRI} = 0 \text{ s}^{-1}$ [24]). Unter der Annahme, dass aufgrund der Ähnlichkeit von *Rh 110* und *Rh 123* (vergleiche Kapitel 5.12) die entsprechenden Konstanten gleich sind, kann die gesamte² Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung des *Rh 110*, im Bereich der niedrigen Leistungsdichten, bei denen das optimale Verhältnis F/U

¹ Die zusätzliche Messungen der Fluoreszenzabnahme des *Rh 110* am im Kapitel 3.2.3.7 beschriebenen Aufbau, die es ermöglichen würden die Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung des *Rh 110* direkt zu bestimmen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

² Es könnte bei keiner der durchgeführten Messreihen auch bei hohen Leistungsdichten ein zusätzlicher Korrelationsterm der Photozerstörung beobachtet werden. Deswegen kann angenommen werden, dass bei kleineren Leistungsdichten die Photozerstörung aus den höher angeregten Zuständen vernachlässigbar für die gesamte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung ist.

beobachtet wird (Kapitel 3.2.8.3), mit Hilfe der Gleichung 3.2-78 (Seite 153) berechnet werden. Der Wert der gesamten Geschwindigkeitskonstante für *Rh 110* ohne Additive beträgt $k_{btot} = 200 \text{ s}^{-1}$ bzw. in Gegenwart der Additive *AZB-C* und *A-AZB-C* mit der Konzentration von $[Q] = 1 \text{ mM}$ beträgt der Wert der Geschwindigkeitskonstante $k_{btot} = 120 \text{ s}^{-1}$. Die Wirkung der Photozerstörung auf das Fluoreszenzsignal eines Fluorophors besteht darin die gesamte Anzahl der Photonen die ein Fluorophor emittieren kann zu limitieren, wobei diese Limitierung nur dann relevant wird, wenn die Fluorophore über einen längeren Zeitabschnitt beobachtet werden ($\Delta t > k_{btot}^{-1}$).

Die mittlere Anzahl der Fluoreszenzphotonen, die ein Fluorophor emittiert bevor er geblichen wird, kann über die Quantenausbeute der Photozerstörung, die der inversen Anzahl der überlebten Absorptionszyklen eines Fluorophors entspricht, bestimmt werden ([80] Kapitel 1.2 Gleichung 1.2-4 und Gleichung 1.2-6). Die Quantenausbeute der Photozerstörung für *Rh 110* ohne Additive bzw. für *Rh 110* in Gegenwart von 1 millimolaren *AZB-C* oder *A-AZB-C* Lösung beträgt $\Phi_b = 8 \cdot 10^{-7}$ bzw. $\Phi_{b(Additiv)} = 5 \cdot 10^{-7}$. Damit beträgt die mittlere Anzahl der Fluoreszenzphotonen, die *Rh 110* emittieren kann bevor er geblichen wird, für den Fall ohne Additive $\langle N_{ph(max)} \rangle = 1.1 \cdot 10^6$ bzw. $\langle N_{ph(max)} \rangle = 1.8 \cdot 10^6$ in Gegenwart von 1 millimolaren Lösung der Additive *AZB-C* oder *A-AZB-C*. Entsprechend beträgt die mittlere Anzahl der Fluoreszenzphotonen eines *Rh 110* Moleküls, die bei den Fluoreszenzmessungen am verwendeten Fluoreszenzaufbau (Kapitel 3.2.3.7) detektiert werden können (Gleichung 3.2-81) $\langle N_{detect(max)} \rangle = 2.2 \cdot 10^4$ ohne additive bzw. in Gegenwart von 1 millimolaren *AZB-C*¹ oder *A-AZB-C* Lösung $\langle N_{detect(max)} \rangle = 3.6 \cdot 10^4$.

$$\langle N_{detect(max)} \rangle = \langle N_{ph(max)} \rangle \cdot G_{detect} = \Phi_b^{-1} \cdot \Phi_F(Q) \cdot G_{detect} \quad 3.2-81$$

¹ Bei *Rh 123* konnte zusätzlich eine zehnfache Steigerung der Photostabilität des Fluorophors erreicht werden, wenn der Sauerstoff aus der Lösung entfernt wurde (Kapitel 3.2.9.4). Da Rahmen dieser Arbeit keine Messungen des *Rh 110* ohne Sauerstoff durchgeführt wurden, wird auf die Betrachtung des Einflusses von Sauerstoff auf die Photostabilität des *Rh 110* im Rahmen dieser Diskussion verzichtet.

$$G_{detect} = 0.02 \text{ (Kapitel 3.2.3.11)}, \Phi_F = 0.89 \text{ (Kapitel 3.2.3.1)}^1$$

Die Geschwindigkeitskonstanten für Photozerstörung aus dem Radikalanionzustand des *Rh 110* oder des *Rh 123* sind nicht bekannt, und konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Deswegen kann die mittlere Anzahl der Fluoreszenzphotonen $\langle N_{ph(max)} \rangle$ bzw. $\langle N_{detect(max)} \rangle$ für die Messreihen mit *Trolox* nicht direkt berechnet werden. Gleichzeitig kann ausgeschlossen werden, dass die Geschwindigkeitskonstanten für die Photozerstörung aus dem Anionzustand wesentlich größer sind als die bereits bekannten Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung aus anderen Zuständen, da im Falle von schneller Photozerstörung ein zusätzlicher Korrelationsterm bei der Auswertung der *FCS*-Daten beobachtet werden müsste, was bei keiner der ausgewerteten Messreihen der Fall gewesen ist. Damit muss die mittlere Anzahl der Fluoreszenzphotonen, die *Rh 110* emittieren kann bevor er geblichen wird, in gleicher Größenordnung liegen wie bei *Rh 110* ohne Additive, auch wenn die Population des Radikalanionzustands in Gegenwart des Additivs *Trolox* nicht vernachlässigt werden kann. Für die Fluoreszenzmessungen am konfokalen Fluoreszenzaufbau mit frei diffundierenden Fluorophoren, kann die mittlere Anzahl der detektierten Photonen ($\langle N_{detect} \rangle$) von einem Fluorophor bevor er aus dem Detektionsvolumen diffundiert mit Hilfe der Fluoreszenzzählrate eines Moleküls und der Relaxationszeit des Korrelationsterms der Diffusion leicht bestimmt werden. Für den im Kapitel 3.2.3.7 beschriebene Fluoreszenzaufbau (mit $F_{cpm} \approx 2 \text{ MHz}$ Kapitel 3.2.8.2, $t_d < 0.15 \text{ ms}$ Kapitel 2.4.1) beträgt die mittlere Photonenzahl $\langle N_{detect} \rangle \ll 10^3$. Bei $\langle N_{detect(max)} \rangle \approx 2 \cdot 10^4$ (siehe oben) ist $\langle N_{detect} \rangle \ll \langle N_{detect(max)} \rangle$ was eindeutig zeigt, dass die Photozerstörung vernachlässigbar bei den Messungen am dem Fluoreszenzaufbau ist. Dies bestätigt die bei der Auswertung der Korrelationsterme gemachte Beobachtung einer für die Besetzung der elektronischen Zustände des *Rh 110* vernachlässigbaren Photozerstörung (Kapitel 3.2.4.3).

¹ Bei den Konzentrationen des Additivs von $[Q] \leq 1 \text{ mM}$ ist die Singulettlöschung vernachlässigbar (Kapitel 3.2.3.6), damit gilt $\Phi_F(Q) \approx \Phi_F$

3.3 *Mikrofluidischer Mixer*

3.3.1 *Vorwort*

Die in diesem Kapitel präsentierten Daten sollen für eine Veröffentlichung eingereicht werden. Aus diesem Grund sind die Daten in Form eines Manuskripts in englischer Sprache zusammengefasst, welches nicht ins Deutsche Sprache übersetzt, und als eigenständiges Kapitel (Anhang Manuskripte) in diese Arbeit eingefügt wird. Eine Zusammenfassung des Manuskripts zusammen mit den Teilen der Arbeit, die nicht in das Manuskript eingeflossen sind, sind nachfolgend in den Kapiteln 3.3.2-3.3.4 beschrieben.

3.3.2 Einleitung

In diesem Kapitel werden Fluoreszenzmessungen in einem mikrofluidischen Mixer (Mikromixer) an einem Fluoreszenzaufbau beschrieben.

Der in dieser Arbeit verwendete Mikromixer funktioniert im Wesentlichen wie eine Continuous Flow Anlage (Abbildung 3.3-1) [81]. Die Reaktionspartner aus den Probenkammern A und B werden zum Mischkanal geleitet in dem sie miteinander vermischt werden. Der Fortschritt der Reaktion wird im Detektionskanal beobachtet (Abbildung 3.3-3, Abbildung 3.3-5).

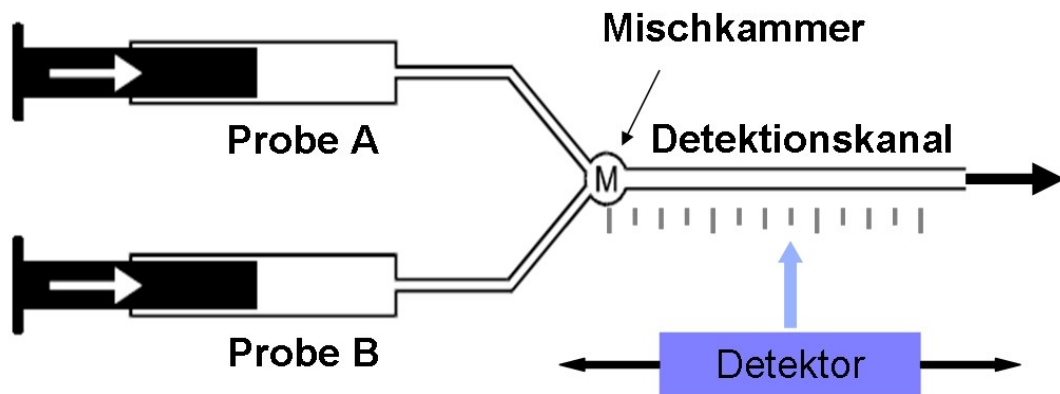


Abbildung 3.3-1 Funktionsprinzip einer Continuous Flow Anlage, Probe A und B werden kontinuierlich miteinander vermischt, die Reaktionsdauer für detektierte Produkte ist abhängig von der Flussrate und dem Abstand des Detektors von der Mischkammer.

Die Skalierung des gesamten Systems auf den Mikrometermaßstab (Abbildung 3.3-2) erlaubt die Einsicht in die Reaktionskinetiken auf.

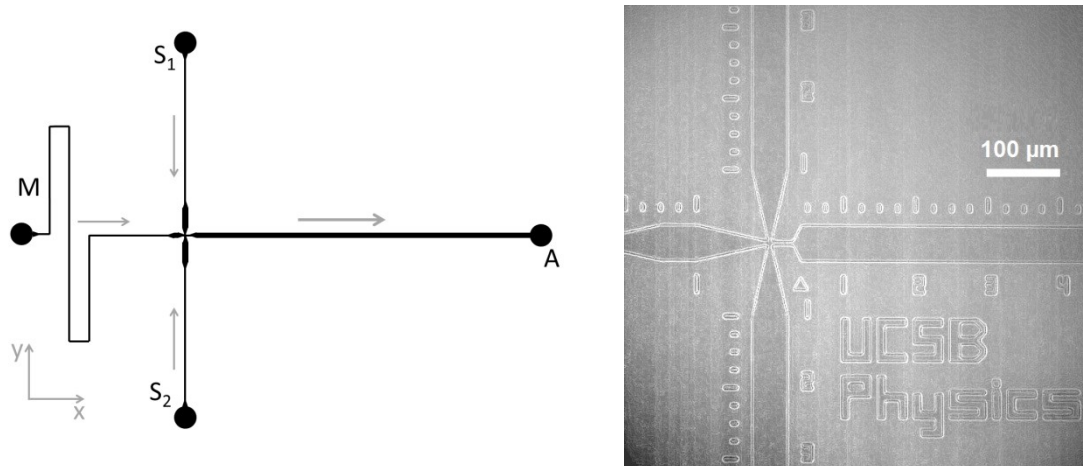


Abbildung 3.3-2 Links: schematische Darstellung der gesamten Kanäle des Mikromixers. Der Mikromixer verfügt über drei Probenkammern (seitlichen S_1 und S_2 und mittlere M) die über langen Kanäle an einem Mischkanal angebunden sind. Alle drei Eingangskanäle, die entsprechend zu den Probenkammern auch mit den Abkürzungen S_1 , S_2 und M gekennzeichnet werden, münden in einem schmalen Mischkanal. Der Mischkanal mündet im breiteren Beobachtungskanal, wo mittels eines Fluoreszenzaufbaus Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden können. Am Ende des Beobachtungskanals befindet sich der Ausgang (A) mit einem Reservoir für die Reaktionsprodukte. Rechts: Aufnahme der Mischregion des Mikromixers. Die langen und kurzen Markierungen oberhalb des Detektionskanals (breiter Kanal rechts im Bild) dienen der Orientierung für die Positionierung des Konfokaltvolumens. Der Abstand zwischen den langen Markierungen beträgt $100\ \mu\text{m}$. Die dreieckige Markierung unterhalb des Detektionskanals markiert die erste mögliche Position für Messungen im Detektionskanal (siehe auch Abbildung 3.3-5).

Die laminaren Flussbedingungen in den Kanälen erlauben eine leichte Kontrolle der Flussraten im gesamten mikrofluidischen System [20]. Die Erzeugung des Flusses erfolgt mittels Druckdifferenz zwischen den Eingängen und dem Ausgang des Mixers (siehe Abbildung 3.3-3). Im Mikromixer mit laminaren Strömungsprofilen können sich die Reaktionspartner nur durch die Diffusion im Mischkanal mischen. Daher wird die Zeitauflösung (τ_d) des Mikromixers durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Reaktionspartner, die Länge des Mischkanals und die Flussgeschwindigkeit bestimmt.

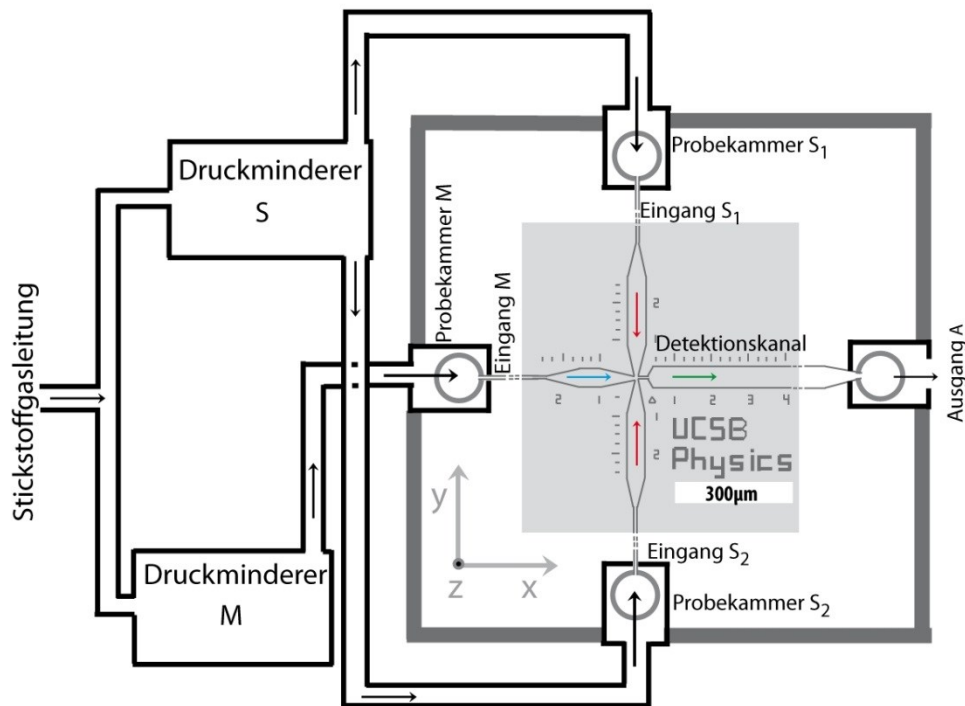


Abbildung 3.3-3 Schematische Darstellung der Druckinstallation zur Erzeugung und Kontrolle der Strömungen in der mikrofluidischen Zelle. Das Koordinatensystem wird für die gesamte Arbeit so definiert, dass der Detektionskanal entlang der x-Achse und die Seiteneingänge entlang der y-Achse orientiert sind. Bei der Druckinstallation wurden die Druckminderer (Swagelok KPR1CFC422C20000) mit einem digitalen Manometer (GE DPI 104) verwendet.

Die Zeitauflösung eine Continuous Flow Messung wird allgemein bestimmt durch die Zeit, die gebraucht wird, um die Reaktionspartner in der Mischkammer zu vermischen. Im Mikromixer bestimmt die Flussgeschwindigkeit im Mischkanal (Abbildung 3.3-5) zusammen den Diffusionsgeschwindigkeit der Reaktionspartner die Zeitauflösung. Bei zu langsamer Flussgeschwindigkeit im Mischkanal können die Reaktionspartner gegen den Strom im Mischkanal diffundieren, was dazu führt, dass eine Reaktion der Reaktanten vor dem Mischkanal stattfinden würde. Umgekehrt bei zu schneller Flussgeschwindigkeit im Mischkanal, werden die Reaktionspartner durch den Mischkanal transportiert, bevor sie sich mit Hilfe der Diffusion vermischen.

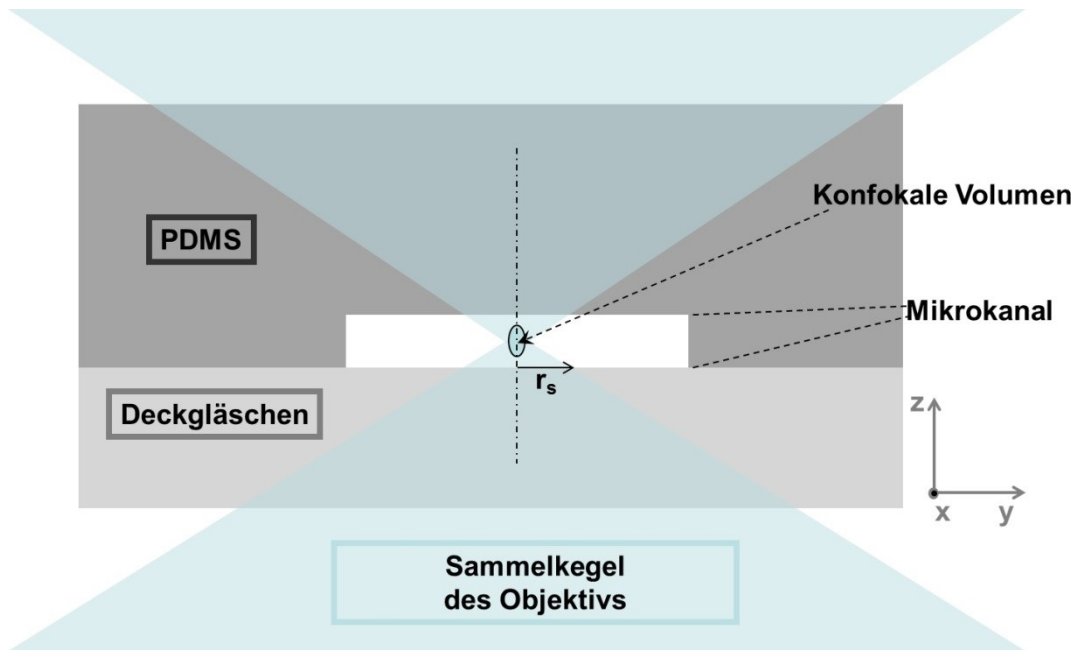


Abbildung 3.3-4 Schematische Darstellung der konfokalen Messungen innerhalb einer mikrofluidischen Zelle.

r_s steht für Radius der Schnittfläche zwischen dem Boden des Mikrokanals und dem Sammelkegel des Objektivs, wenn das konfokale Volumen exakt auf der halben Höhe des Kanals platziert wird. Dunkelgrau repräsentiert Polydimethylsiloxan (PDMS). Hellgrau repräsentiert Glas.

Die Zeitauflösung von Continuous Flow Messungen sind weiter limitiert durch den minimal möglichen Abstand des Detektors zur Mischkammer in Flussrichtung. Im Falle des Mikromixers wird ein konfokales Fluoreszenzmikroskop für die Messungen verwendet (Abbildung 2.3-1). Hier wird das Anregungslicht direkt in die Mitte der Mikrokanälen fokussiert und das Fluoreszenzlicht mit dem gleichen Objektiv gesammelt. Der Sammelkegel des Objektivs bestimmt den Mindestabstand des konfokalen Volumens von dem Mischkanal. Für den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mikromixer beträgt der minimale Abstand des Detektors vom Mischkanal $10\ \mu\text{m}$ (Abbildung 3.3-5) [20]. Der gezeigte Mikromixer ist optimiert für kleinere organische Moleküle (zB. Harnstoff $D = 14 \cdot 10^{-6}\ \text{cm}^2/\text{s}$ [82] als Reaktionspartner bei Proteinfaltung) und einer mittleren Strömungsgeschwindigkeit von $4\text{-}30\ \mu\text{m}/\text{ms}$ im Mischkanal. Damit beträgt die maximale Zeitauflösung des Mikromixers circa $\tau_d = 1.8\ \text{ms}$ (Tabelle 3.3-1 [20]).

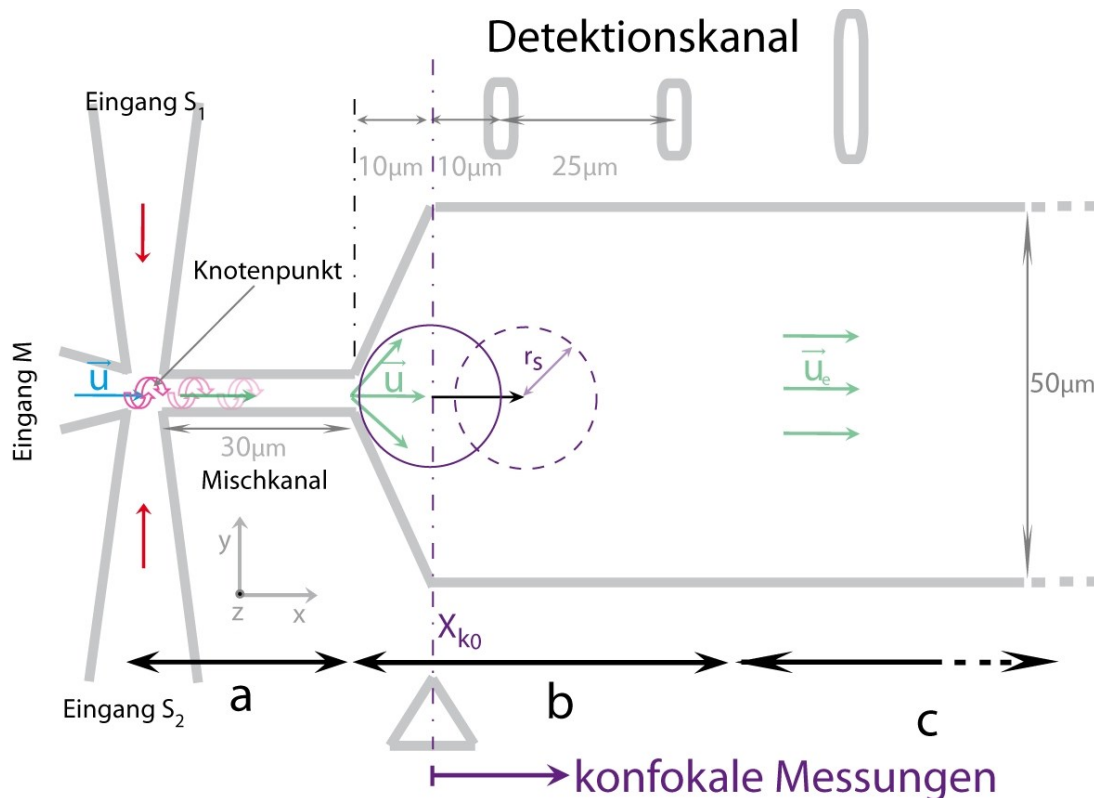


Abbildung 3.3-5 Ausschnitt aus der Mitte des Mikromixers. Die Vermischung der Reaktionspartner erfolgt mittels Diffusion hauptsächlich im 5 µm breiten und 30 µm langen Mischkanal (Abschnitt a). Im Abschnitt b des Detektionskanals findet die Änderung des Strömungsprofils (Parabolisch → Pflugartig [83]) aufgrund des Breiteunterschieds zwischen dem Mischkanal und Detektionskanal statt. Dieser Abschnitt wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „Abbrennsabschnitt“ bezeichnet, weil die Flussgeschwindigkeit in diesem Abschnitt mit steigender Entfernung vom Mischkanal abnimmt. Im Abschnitt c des Detektionskanals ist die Strömung voll entwickelt, d.h. das Strömungsprofil entlang des Detektionskanals ändert sich nicht mehr. Entsprechend bleibt ab hier die Flussgeschwindigkeit bei steigender Entfernung vom Mischkanal konstant. Die dreieckige Markierung (unten im Bild) zeigt den Mindestabstand ($x_{k0} = 10 \mu m$) von dem Mischkanal in x-Richtung, bei dem der Sammelkegel des Objektivs (violette Kreis) die Wände des Kanals nicht berührt (siehe auch Abbildung 3.3-4).

Die Fluoreszenzmessungen in einem Micromixer erfordern die genaue Kenntnis der in den Kanälen vorherrschenden Strömungsprofile, welche mittels Strömungssimulationen (CFD, eng. Computational fluid dynamics) bestimmt werden können. Die Genauigkeit der berechneten Strömungen wird durch die Herstellungsprozess bedingte Abweichungen der Dimensionen der Kanäle von etwa 1 µm eingeschränkt. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit, zusätzlich zu den Strömungssimulationen, die Strömungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) direkt gemessen. Die Charakterisierung der Strömungsprofile in den Mikrokanälen mittels FCS erfordert eine Vielzahl von einzelnen FCS-Messungen. Umgekehrt wurde die aus Strömungssimulationen resultierende

Kenntnis der Flussprofile in Kombination mit *FCS* dazu verwendet, um die Diffusionseigenschaften einer fluoreszierenden Probe exakt zu ermitteln, was mittels *FCS*-Messungen allein nicht möglich wäre.

Tabelle 3.3-1 [20] Die für den Strömungsgeschwindigkeitsbereich von 4-30 $\mu\text{m/ms}$ im Mischkanal notwendigen Druckdifferenzen zwischen den Eingängen und Ausgängen des Mikromixers (Δp), die maximale Zeitauflösung (τ_d) für die Messungen der Reaktionskinetiken und die Flussgeschwindigkeiten im Abschnitt mit dem vollentwickelten laminaren Strömungsprofil (u_e) und die Flussgeschwindigkeiten am Punkt x_{k0} (u_{k0}) (Abbildung 3.3-5)). Die Zeitauflösung τ_d entspricht der mittleren Zeit, die Moleküle brauchen um von dem Knotenpunkt bis zu dem Punkt x_{k0} bei gegebenen Strömungsgeschwindigkeit zu gelangen. Alle Werte wurden mittels numerischen Simulationen mit Wasser als Lösungsmittel mit einer Viskosität von $\eta = 1.0 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, einer Probe mit dem Diffusionskoeffizient von $D = 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und einer Druckdifferenz mit der Bedingung $\Delta p = \Delta p_s = \Delta p_m$ (gleiche Druck an den Seiteneingängen und dem Mitteleingang) berechnet. Die Flussgeschwindigkeiten u_e und u_{k0} repräsentieren die maximalen Flussgeschwindigkeiten in der Mitte des Detektionskanals.

$\Delta p [\text{kPa}]$	$\tau_d [\text{ms}]$	$u_{k0} [\mu\text{m/ms}]$	$u_e [\mu\text{m/ms}]$
3	18.9	1.0	0.4
4	11.7	1.4	0.6
6.9	6.3	2.4	1.0
12.4	3.1	4.3	1.8
20.2	1.8	7.2	3.0

Darüber hinaus können die mittels *CFD* berechneten Flussprofile dazu verwendet werden, um die Position des konfokalen Volumens im Detektionskanal exakt zu bestimmen, was die Zeitauflösung von Continuous Flow Messungen erhöhen wird.

Die Einsatzmöglichkeit des Mikromixers für Einzelmolekülmessungen wird durch die Anzahl der Photonen begrenzt, die notwendig ist um zu Diskriminierung des Fluoreszenzsignals von dem Untergrundsignal und dessen Analyse durchzuführen (Kapitel 2.4, [84]). Gleichzeitig bewirkt der Fluss im Mikromixer eine Verkürzung der Verweildauer der Fluorophore im Detektionsvolumen, was eine Verringerung der detektierten Anzahl der Fluoreszenzphotonen zufolge hat. Deswegen wurde das Radikalkation- und Triplettzustände löschende Additiv (*A-AZB-C*) (Kapitel 3.2.2) für die Einzelmolekülmessungen von *Rhodamin 123* unter Flussbedingungen verwendet. Die fluoreszenzsignalsteigernde Wirkung des Additivs sollte den Einsatz des Mikromixers bei schnellen Flussgeschwindigkeiten ermöglichen, da die flussbedingte Verringerung des Fluoreszenzsignals durch das Additiv kompensiert werden kann.

3.3.3 Methoden

3.3.3.1 Herstellung des Mikromixers

Zum Herstellen der *PDMS*-Matrix (*PDMS* steht für Polydimethylsiloxan) wird eine negative Form der Kanäle in Silizium oder Glas benötigt (wird üblicher Weise mittels Fotolithografie aus Siliziumwafer hergestellt) [20]. Die Siliziumform für in dieser Arbeit präsentierte mikrofluidische Zelle wurde von Shawn H. Pfeil in dem Reinraumlabor der Universität in Santa Barbara aus einem Siliziumwafer angefertigt.

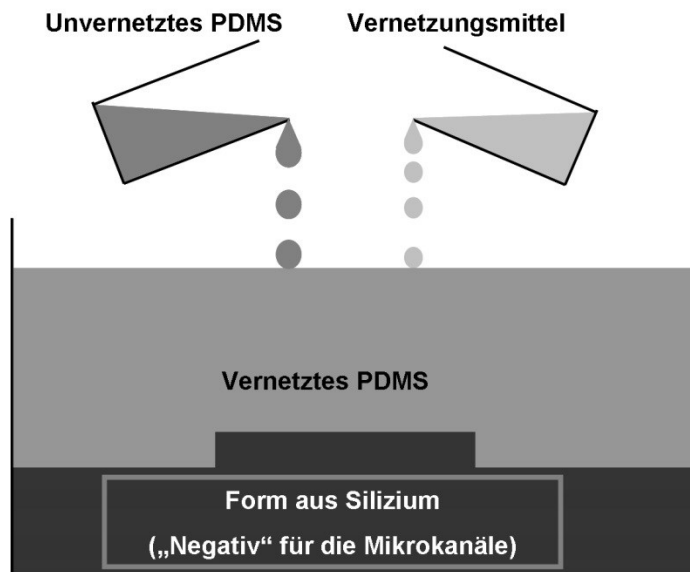


Abbildung 3.3-6 Herstellung der Mikrostrukturen aus PDMS

Um die *PDMS*-Matrix herzustellen, wird das unverletzte *PDMS* (*RTV615* Komponente A) mit einem Vernetzungsmittel (*RTV615* Komponente B) vermischt (10/1) und auf das Siliziumnegativform gegossen (Abbildung 3.3-6). Nach dem Aushärten von *PDMS* wird das Negativ entfernt. So erhält man einen festen Abdruck der mikrofluidischen Zelle in *PDMS*.

Danach wird der *PDMS* Abdruck auf ein Deckgläschen platziert. Das Deckgläschen schließt die Kanäle nach unten ab und erlaubt gleichzeitig Fluoreszenzmessungen in den Kanälen mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes (Abbildung 2.3-1)

Zusätzlich wird ein Gehäuse mit Druckanschlüssen benötigt, um mittels Gasdruck den Fluss in den Mikrokanälen zu erzeugen [20] (Abbildung 3.3-7, Abbildung 3.3-3).

Die Kontrolle des Drucks erfolgt durch zwei Druckminderer (Swagelok KPR1CFC422C20000) mit einem digitalen Manometer (GE DPI 104)

(vergleiche Abbildung 3.3-3). Der Druck an den beiden Druckminderer wird relativ zum Druck am Ausgang des Mixers (atmosphärischen Druck im Labor) eingestellt. Über die beiden Druckminderer werden sowohl die Strömungsgeschwindigkeiten als auch das Mischungsverhältnis im Beobachtungskanal mit einer Genauigkeit von $\pm 2\%$ eingestellt (Abbildung 3.3-3).

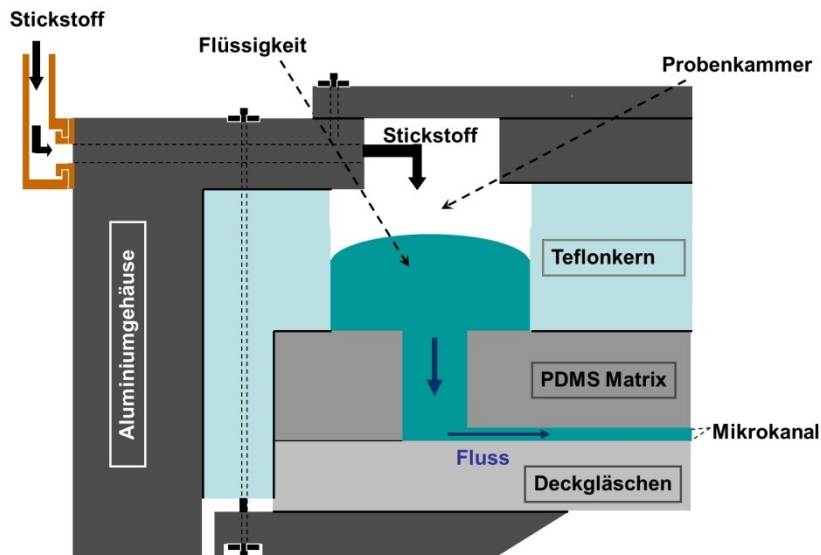


Abbildung 3.3-7 Ausschnitt aus dem Gehäuse zur Erzeugung von Druck

3.3.3.2 Strömung einer inkompressiblen Flüssigkeit in rechteckigen Kanälen

Die Bewegung eines Volumenelements (dV) in einer inkompressiblen Flüssigkeit wird durch die Navier-Stokes-Gleichung (Gleichung 3.3-1) beschrieben. Die rechte Seite der Navier-Stokes-Gleichung repräsentiert die wirkenden Kräfte auf das Volumenelement (Druckkraft $F_p = -\nabla p \cdot dV$ und Reibungskraft $F_R = \eta \cdot \nabla^2 u$) [85], die linke Seite die daraus resultierende Impulsänderung des Volumenelements.

$$\rho \cdot \left(\frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \nabla) u \right) = -\nabla p + \eta \cdot \nabla^2 u \quad 3.3-1$$

u = Flussgeschwindigkeit
 p = Druck
 η = dynamische Viskosität
 ρ = Dichte

Das Verhältnis zwischen den Trägheitskräften und den Reibungskräften einer strömenden Flüssigkeit wird durch die einheitslose Reynoldszahl Re

(Gleichung 3.3-2) repräsentiert. Wobei bei großen Reynoldszahlen ($Re > 2000$) im Allgemeinen mit dem Auftreten von Turbulenzen gerechnet wird. Die Strömung wird in solchen Fällen als turbulent bezeichnet. Bei kleinen Reynoldszahlen werden keine Turbulenzen erwartet. Solche Strömung wird als laminare Strömung bezeichnet.

$$Re = \frac{u \cdot d \cdot \rho}{\eta} \quad 3.3-2$$

u = Flussgeschwindigkeit

d = Dimension des Kanals

η = dynamische Viskosität des strömenden Mediums

ρ = Dichte des strömenden Mediums

Die Kanalhöhe im eingesetzten Mikromixer beträgt durchgehend $h = 10 \mu\text{m}$ die Breite variiert im Bereich von $w = 5-50 \mu\text{m}$. Damit bewegt sich die Reynoldszahl in der Größenordnung von $Re \approx 10^{-3}$. Es werden somit ausschließlich laminare Strömungen erwartet.

Für laminar strömende inkompressible Flüssigkeit lässt sich die Navier-Stokes-Gleichung zur Stokes-Gleichung (Gleichung 3.3-3) vereinfachen.

$$0 = -\nabla p + \eta \cdot \nabla^2 u \quad 3.3-3$$

u = Flussgeschwindigkeit

p = Druck

η = dynamische Viskosität

Die analytische Lösung der Stokes-Gleichung für eine zylinderförmige Kapillare liefert ein parabolisches Flussprofil mit einem Maximum in der Mitte des Zylinders (Gleichung 3.3-4)¹. Die Integration führt zum Hagen-Poiseuille Gesetz (Gleichung 3.3-5).

$$u(r) = \frac{-dp}{dl} \cdot \frac{r_z^2}{4 \cdot \eta} \left(1 - \frac{r^2}{r_z^2} \right) = u_{\max} \cdot \left(1 - \frac{r^2}{r_z^2} \right) \quad 3.3-4$$

¹ Für die Herleitung der Gleichung wird die Randbedingung $u(r = r_z) = 0$ benötigt.

$$Q = \frac{\partial V}{\partial t} = \frac{-dp}{dl} \cdot \frac{\pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta} \quad 3.3-5$$

$$R_h = -\frac{dp}{Q} = \frac{dl \cdot 8 \cdot \eta}{\pi \cdot r^4} \quad 3.3-6$$

u = Flussgeschwindigkeit

Q = Volumenstrom

V = Volumen

p = Druck

R_h = Kanalwiderstand

η = dynamische Viskosität

r = Abstand von der Mitte des Zylinders

r_z = Radius des Zylinders

r = Radius der Kapillare

l = Länge der Kapillare

Analog gelten für die Strömungsgeschwindigkeit und den Volumenstrom in einer rechteckigen Kapillare mit Druckgradient in x-Richtung Gleichungen 3.3-7 und 3.3-8 [83, 85]. Das Umstellen der Gleichung 3.3-8 nach $-dp/Q$, liefert den hydrodynamischen Widerstand (Gleichung 3.3-9) für eine beliebige rechteckige Kapillare.

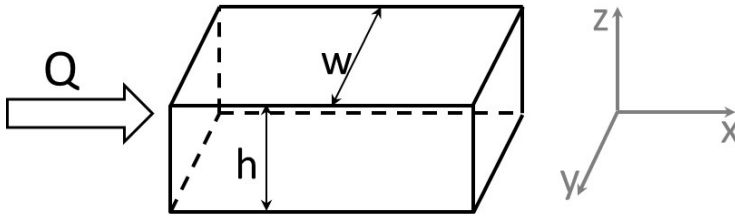


Abbildung 3.3-8 Rechteckige Kapillare mit Höhe h und Breite w

$$u(y,z) = -\frac{dp}{dx} \cdot \frac{1}{2\eta} \cdot \left(\frac{h^2}{4} - z^2 + \frac{8}{h} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{\left(\frac{\pi}{h} \cdot (2n-1)\right)^3} \cdot \frac{\cosh\left[\frac{\pi}{h} \cdot y \cdot (2n-1)\right]}{\cosh\left[\frac{\pi}{h} \cdot \frac{w}{2} \cdot (2n-1)\right]} \cdot \cos\left[\frac{\pi}{h} \cdot z \cdot (2n-1)\right] \right) \quad 3.3-7$$

$$Q = -\frac{dp}{dx} \cdot \frac{h^3 \cdot w}{12 \cdot \eta} \cdot \left(1 - \frac{192 \cdot h}{\pi^5 \cdot w} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \cdot \tanh\left[(2n-1) \cdot \frac{\pi \cdot w}{2 \cdot h}\right] \right) \quad 3.3-8$$

$$R_h = -\frac{dp}{Q} = \frac{dx}{\frac{h^3 \cdot w}{12 \cdot \eta} \cdot \left(1 - \frac{192 \cdot h}{\pi^5 \cdot w} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \cdot \tanh\left[(2n-1) \cdot \frac{\pi \cdot w}{2 \cdot h}\right] \right)} \quad 3.3-9$$

Q = Volumenstrom
 u = Flussgeschwindigkeit
 p = Druck
 R_h = Kanalwiderstand
 η = dynamische Viskosität
 w = Breite der Kapillare
 h = Höhe der Kapillare

3.3.3.3 Analogie zum Ohm'schen Gesetz

Die Drücke und Strömungen in einem verbundenen Kanalsystem mit durchgehend laminaren Strömungsbedingungen lassen sich analog zu elektrischen Strom und elektrischen Widerstand berechnen. Die Gleichung 3.3-9 kann in eine Form analog zum Ohm'schen Gesetzes umgeschrieben werden (Gleichung 3.3-10). Dabei ist der Volumenstrom Q analog zur elekt. Stromstärke, der Druck p analog zur elekt. Spannung und die Proportionalitätskonstante R_h analog zum elekt. Widerstand.

$$Q = -\frac{\Delta p}{R_h} \quad 3.3-10$$

Q = Volumenstrom
 R_h = hydrodynamischer Widerstand der Kapillare
 p = Druck

Tabelle 3.3-2 Dimensionen und Strömungswiderstand (für Wasser $\eta = 1.0 \text{ mPa s}$) der rechteckig geformten Abschnitte der Kanäle des mikrofluidischen Mixers, berechnet nach der Gleichung 3.3-9 [20]. Die Höhe der Kanäle im gesamten Mikromixer beträgt $10 \text{ }\mu\text{m}$.

Kanal	Widerstand R_h [kPa s/nL]	Breite [μm]	Höhe [μm]	Länge [μm]
Eingang M	111.89	5	10	8000
Eingang S	47.03	6	10	5300
Detektionskanal	3.02	50	10	11000
Mischkanal	0.42	5	10	30

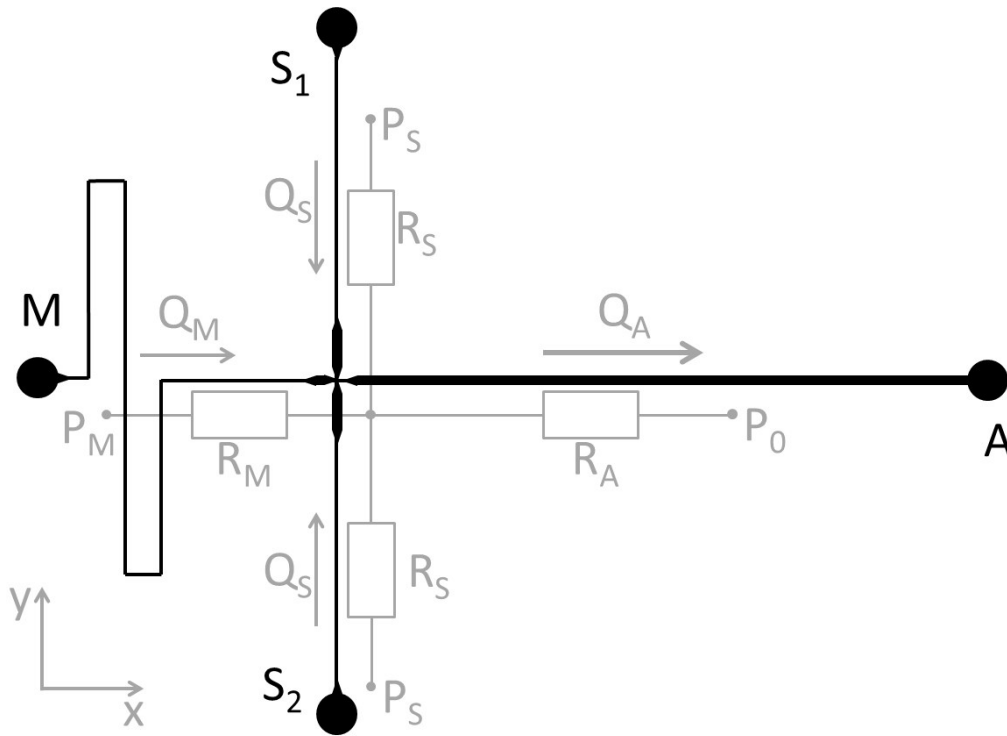


Abbildung 3.3-9 Vier Widerstands Modell zur Beschreibung des Flusses im Mikromixer [86]. R und Q stehen für den hydrodynamischen Widerstand und den Volumenstrom. Die Indizes A, M, S stehen für Ausgang, Mitteneingang und Seiteneingang (näheres siehe Kap 3.3.3.4). Bei der gegebenen Geometrie des Mixers sind die hydrodynamischen Widerstände der nicht rechteckig geformten Teile der Kanäle vernachlässigbar klein im Vergleich zu den Widerständen der mm langen rechteckig geformten Abschnitte der Kanäle (Tabelle 3.3-2). Der Druck am Ausgang (P_0) ist der atmosphärische Druck im Labor, dieser Druck wird als Referenz für die an den Eingängen eingestellten Drücke verwendet.

Mit dieser Analogie zwischen hydrodynamischen und elektrischen Netzwerken können auch die beiden Kirchhoffschen Gesetze für die Berechnung des Druckes und des Volumenstromes im mikrofluidischen Systems angewandt werden (siehe Abbildung 3.3-9) [86].

$$\frac{P_S - P_0}{P_M - P_0} = \frac{1 + 2\sigma - m_v}{2 \cdot (\sigma + \gamma \cdot m_v)} \quad 3.3-11$$

$$P_M - P_0 = R_S \cdot (\sigma + m_v \cdot \gamma) \cdot Q_D = (R_A + R_M \cdot m_v) \cdot Q_D \quad 3.3-12$$

$$P_M - P_0 = R_S \cdot (\sigma + m_v \cdot \gamma) \cdot U_{\max} \cdot \beta = (R_A + R_M \cdot m_v) \cdot u_{\max} \cdot \beta \quad 3.3-13$$

P = Druck

R_h = Kanalwiderstand

m_v = Mischungsverhältnis ($= Q_M/Q_D$)

Q = Volumenstrom

u_{max} = Maximale Strömungsgeschwindigkeit

β = Volumenstrom/Maximale Strömungsgeschwindigkeit

$R_A = 3.44 \text{ kPa s/nL}$ Widerstand des Ausgangs (Detektionskanal+Mischkanal)

$\sigma = R_A/R_S \approx 0.073$

$\gamma = R_M/R_S \approx 2.379$

Indizes A, M, S, D stehen Für Ausgang, Mitteeingang, Seiteneingang, Detektionskanal

Bei gleichen Druck an den beiden Seiteneingängen $P_S = P_{S1} = P_{S2}$ gilt für das Mischungsverhältnis m im Detektionskanal ($m_v = Q_M/Q_D$ Q_M = Volumenstrom im Mitteleingang, Q_D = Volumenstrom im Detektionskanal) die Gleichung 3.3-11 [20, 86]. Für den Fall, dass alle 3 Eingangsdrücke gleich sind ($P_{S1} = P_{S2} = P_M$) gilt für das Mischungsverhältnis im Detektionskanal $m = 0.174$ [20].

Der Volumenstrom im Detektionskanal hängt von den Drücken P_S , P_M und P_0 ab. Diese Abhängigkeit wird durch Gleichung 3.3-12 beschrieben [20, 86]. Aus den Gleichungen 3.3-7 und 3.3-8 lässt sich das von der Geometrie des Kanals abhängiger Verhältnis (β) zwischen der Maximalen Flussgeschwindigkeit und den Volumenstrom berechnen. Für den Detektionskanal ist $\beta = 0.292 \text{ nLs}^{-1}\mu\text{m}^{-1}\text{ms}$ [20].

3.3.3.4 Numerische Strömungssimulationen

Nach der Einmündung des Mischungskanals in den Detektionskanal (Abbildung 3.3-5 Abschnitt b) ändert sich das Strömungsprofil innerhalb der ersten $50 \mu\text{m}$. Der Grund dafür ist der Breiteunterschied zwischen dem Mischkanal und Detektionskanal [20, 83]. Den Verlauf der Druckänderung und die daraus resultierende Strömungsgeschwindigkeit in diesem Bereich wurde numerisch mittels CFD (eng. computational fluid dynamics) Simulationssoftware OpenFoam (<http://www.openfoam.com/>) nach Finite-Volumen-Verfahren berechnet.

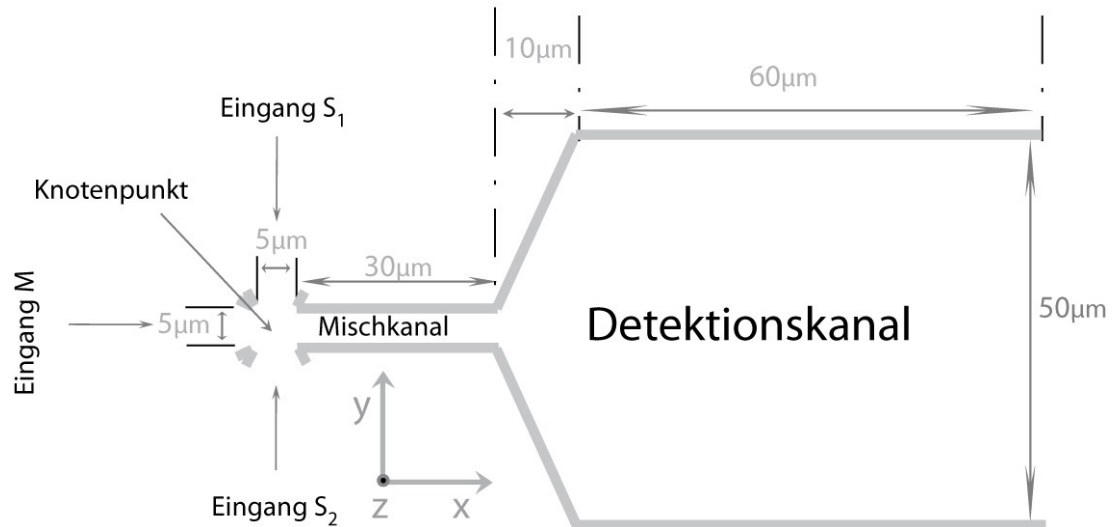


Abbildung 3.3-10 Die Geometrie des Simulationsbereichs des Mikromixers.
Die Höhe der Kanäle betrug im gesamten Simulationsbereich 10 μm

Die Höhe der Kanäle des Mikromixers beträgt durchgehend 10 μm die Breite variiert im Bereich von 5 bis 50 μm . Um ausreichend genaue Ergebnisse bei der Simulation zu erzielen, ist es notwendig, den Simulationsbereich in Volumina mit einer Größe von weniger als 10^{-18} m^3 (Würfel mit der Kantenlänge von 1 μm) zu unterteilen. Unter solchen Bedingungen würde die Simulation des gesamten Mikromixers sehr lange Rechenzeit in Anspruch nehmen. Aus diesem Grund wurde hier nur die Strömung in dem Mischkanal und die ersten 70 μm des Detektionskanals simuliert (Abbildung 3.3-10). Der mittlere Bereich des Detektionskanals und des Mischkanals wurde in Volumina mit Kantenlängen $0.25 \times 0.5 \times 0.25 \mu\text{m}$ unterteilt. Der Rest des Simulationsbereichs wurde in Volumina mit Kantenlängen $1 \times 0.5 \times 0.25 \mu\text{m}$ unterteilt (siehe Abbildung 3.3-11).

Als Input der Simulation wird der Druckverlust zwischen dem Eingang und Ausgang des Simulationsbereichs benötigt. Dieser Druckverlust muss an den Druckverlust des gesamten Mikromixers angepasst werden. Weil die Längen der Eingangskanäle im Simulationsbereich formal gegen null gehen, gehen die hydrodynamischen Widerstände der Eingänge auch gegen null (Gleichung 3.3-9). Unter diesen Voraussetzungen vereinfachensich die Gleichungen 3.3-11, 3.3-12 und 3.3-13 zu

3.3-14, 3.3-15 und 3.3-16 (Der Druck am Ausgang (P_0) wird für Simulation einfacher halber auf 0 kPa gesetzt).

$$P_S = \frac{1 + 2\sigma - m_v}{2\sigma + 2\gamma m_v} \cdot P_M, \quad \sigma \rightarrow \infty, \Rightarrow P_S = P_M \quad 3.3-14$$

$$P_M = (R_{Sim} + R_M \cdot m_v) \cdot Q_D, \quad R_M \rightarrow 0, \quad P_M = R_{sim} \cdot Q_D \quad 3.3-15$$

$$P_M = R_{sim} \cdot U_{max} \cdot \beta \quad 3.3-16$$

P = Druck

R_h = Kanalwiderstand

m_v = Mischverhältnis ($= Q_M/Q_D$)

Q = Volumenstrom

U_{max} = Maximale Strömungsgeschwindigkeit

β = Volumenstrom/Maximale Strömungsgeschwindigkeit

$\sigma = R_{Sim}/R_S$

$\gamma = R_M/R_S$

Indizes Sim, M, S, D stehen Für Simulationsbereich, Mitteeingang, Seiteneingang, Detektionskanal

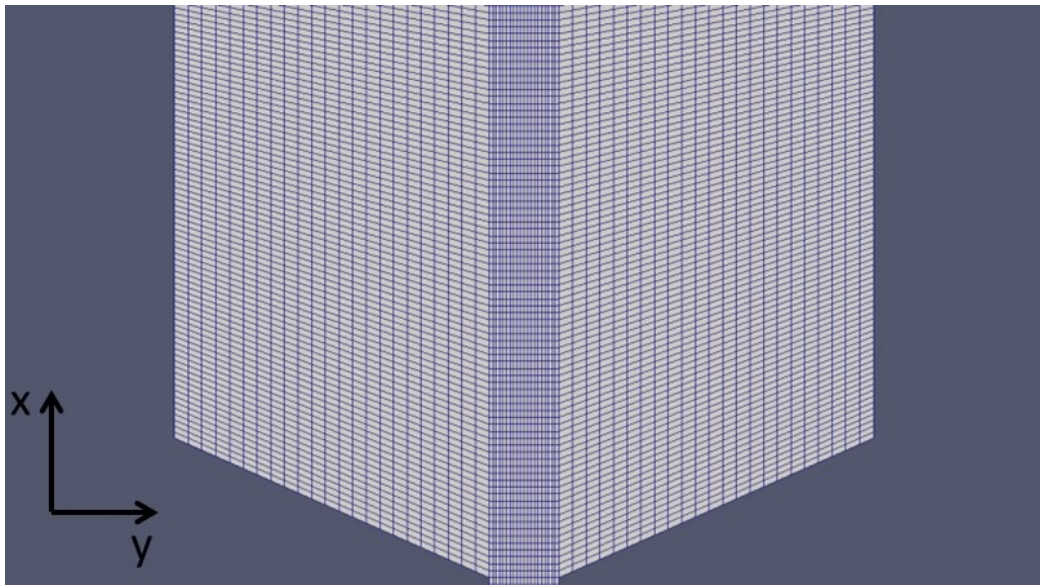


Abbildung 3.3-11 Unterteilung des Detektionskanals in finite Volumenelemente für CFD Simulation (siehe Text oben).

Um die CFD Simulation entsprechend zu den realen Messbedingungen im Mikromixer durchzuführen, ist es notwendig, zuerst den Volumenstrom im Detektionsabschnitt des Mixers nach der Gleichung 3.3-12 zu berechnen. Danach wird der Volumenstrom in Gleichung 3.3-15 eingesetzt, um bei bekanntem

hydrodynamischem Widerstand des Simulationsbereichs (R_{sim}), den Druckverlust für den Simulationsbereich zu bestimmen.

Die relativ kurze Länge des Simulationsbereichs erlaubt es nicht, die nicht rechteckig geformten Abschnitte der Kanäle (vergl. Beschreibung zur Abbildung 3.3-9) bei der Bestimmung des hydrodynamischen Widerstands des Simulationsbereich zu vernachlässigen, und den hydrodynamischen Widerstands des Simulationsbereich direkt zu berechnen. Deswegen muss für den Simulationsbereich das vier Widerstände Modell (Abbildung 3.3-9) modifiziert werden. Die Abbildung 3.3-12 zeigt das modifizierte vier Widerstände Modell für die *CFD* Simulationen. Die hydrodynamischen Widerstände des Simulationsbereichs, für die eine analytische Lösung existiert (Gleichung 3.3-9) sind in der Abbildung 3.3-12 schwarz dargestellt, für die rot dargestellte Widerstände wird eine numerische Lösung benötigt.

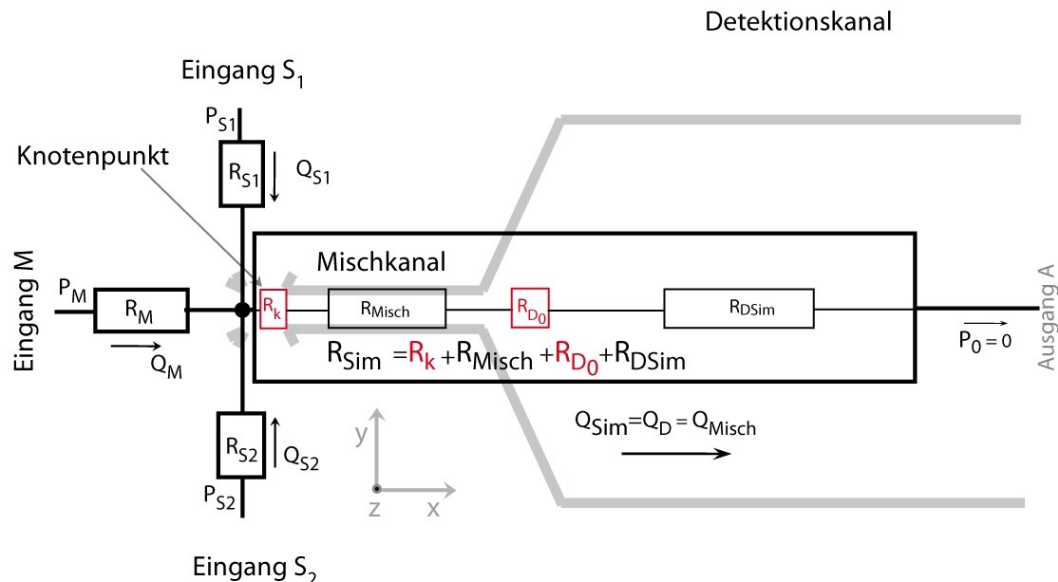


Abbildung 3.3-12 Erweitertes vier Widerstände Modell zur Beschreibung des Flusses im Simulationsbereich des Mikromixers. R und Q stehen für hydrodynamischen Widerstand und Volumenstrom, Indizes K , M , S , D , Sim , $Misch$ stehen für Knotenpunkt, Mitteeingang, Seiteneingang, Detektionskanal, Simulationsbereich, Mischkanal. Die rote Farbe markiert zusätzliche Widerstände, die nicht analytisch berechnet werden können. Diese Widerstände entstehen in nicht rechteckig geformten Verbindungen zwischen Kanälen mit verschiedenen Breiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der benötigte Gesamtwiderstand des Simulationsbereichs direkt mittels numerischer Simulation bestimmt. Dafür wurde die Flussgeschwindigkeit von $0 \mu\text{m/ms}$ als Anfangsparameter für den gesamten Simulationsbereich gewählt. Die Berechnung erfolgte in Zeitintervallen von

$\Delta t(sim) = 5 \text{ ns}$ bei einer Gesamtdauer der Simulation von $t(sim_gesamt) = 50 \mu s$ ¹. Die Druckdifferenz zwischen dem Anfang und dem Ende des Simulationsbereichs war konstant ($\Delta p = 0.153 \text{ kPa}$) über die gesamte Simulationsdauer. Die Ergebnisse der Simulation sind grafisch in Abbildung 3.3-14 und Abbildung 3.3-15 dargestellt. Da die FCS- und Einzelmolekül-Messungen entlang der x-Achse in der Mitte des Detektionskanals durchgeführt wurden, wurde der Druckgradient entlang der gleichen Linie betrachtet (Abbildung 3.3-13).

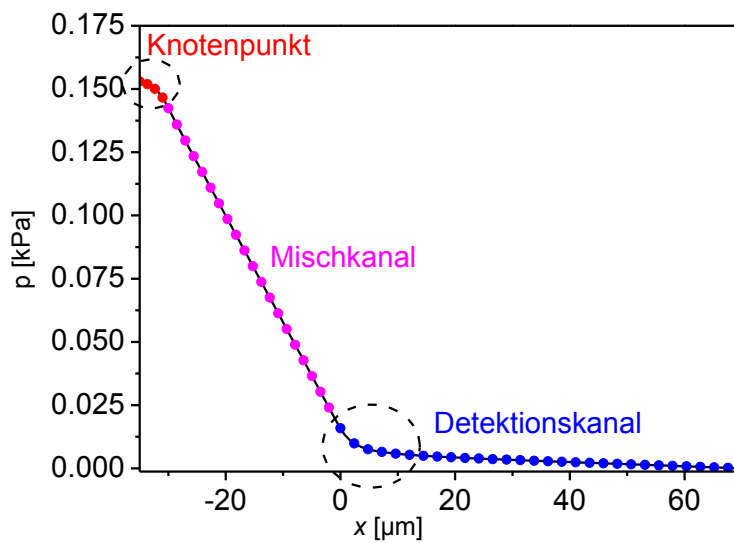


Abbildung 3.3-13 Verlauf des Druckgradienten in x-Richtung in der Mitte des Misch- und Detektionskanals im gesamten Simulationsbereich. Der Volumenstrom betrug $Q = 0.304 \text{ nL/s}$ bei eingestellter Druckdifferenz zwischen dem Anfang und dem Ende des Simulationsbereichs von $\Delta p = 0.153 \text{ kPa}$. Die Stellen mit nicht linear verlaufendem Druckgradient (gestrichelte Kreise) entsprechen Stellen des Simulationsbereichs mit analytisch nicht berechenbaren Widerständen R_k und R_{D0} (Abbildung 3.3-12).

Die gesuchten hydrodynamischen Widerstände können nach der Gleichung 3.3-10 aus der Druckdifferenz (y-Achse der Abbildung 3.3-13) und dem Volumenstrom berechnet werden. Der auf diese Weise ermittelte hydrodynamische Widerstand des Simulationsbereichs (siehe Tabelle 3.3-3) ermöglicht es die Startparameter für die numerischen Simulationen an die Messbedingungen des Mikromixers anzupassen. Damit sind die Strömungsgeschwindigkeiten entlang der Mitte des gesamten Detektionskanals bei gegebenen Messbedingungen exakt berechnet.

¹ Bei dieser Gesamtdauer der Simulation änderte sich die Flusgeschwindigkeit bzw. der Druck am beliebigen Punkt des Simulationsbereichs nicht mehr.

Tabelle 3.3-3 Numerisch berechnete Strömungswiderstände (für Wasser $\eta = 1.0 \text{ mPa s}$) im Simulationsbereich des Mixers

Kanal	Widerstand R_h [kPa s/nL]
Mischkanal+ Knotenpunkt	0.451
Detektionskanal	0.052 ^a
Eingang M	$\rightarrow 0^b$
Eingang S	$\rightarrow 0^b$
Gesamter Simulationsbereich	0.503

^aDer Widerstand des Detektionskanals setzt sich aus dem $70\mu\text{m}$ langen analytisch lösbaren Abschnitt ($R_{Dsim} = 0.019 \text{ kPa s/nL}$) und dem numerisch berechneten Anfangsbereichs ($R_{D0} = 0.033 \text{ kPa s/nL}$) zusammen

^bDer Widerstand der Eingänge geht gegen null, dabei bleibt das Verhältnis $\gamma = R_M/R_S$ konstant..

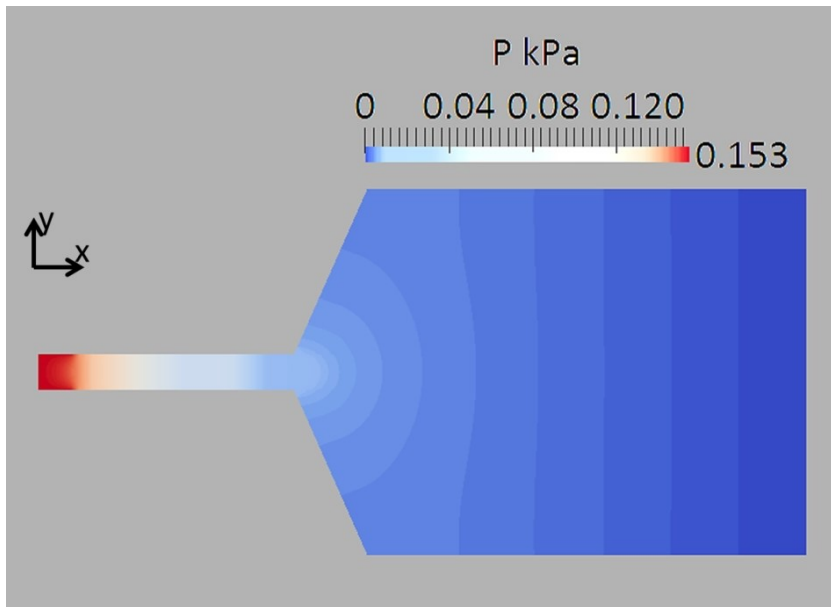


Abbildung 3.3-14 Verlauf des Druckgradienten im Detektionskanal in der Mitte des Misch - und Detektionskanals in der x,y-Ebene. Der Volumenstrom betrug $Q = 0.304 \text{ nL/s}$ bei eingestellter Druckdifferenz zwischen dem Anfang und dem Ende des Simulationsbereichs von $\Delta p = 0.153 \text{ kPa}$

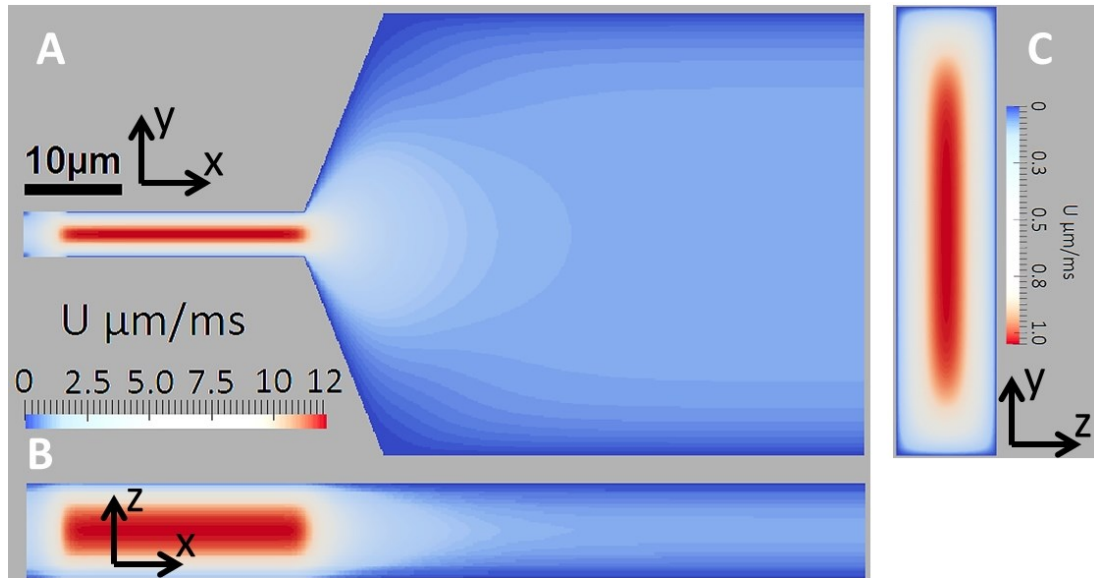


Abbildung 3.3-15 Verlauf der Flussgeschwindigkeit im Simulationsbereich. Der Volumenstrom betrug $Q = 0.304 \text{ nL/s}$ bei eingestellter Druckdifferenz zwischen dem Anfang und dem Ende des Simulationsbereichs von $\Delta p = 0.153 \text{ kPa}$. A) Die Mitte des Misch- und des Detektionskanals in der x,y-Ebene. B) Die Mitte des Misch- und des Detektionskanals in der x,z-Ebene. C) Die y,z-Ebene am Ende des Simulationsbereichs.

3.3.3.5 Fluoreszenzmessungen im mikrofluidischen Mixer (Einzelmolekülfluoreszenzaufbau 2)

Die FCS- und Einzelmolekülmessungen unter Flussbedingungen wurden an einer modifizierten Version des Fluoreszenzaufbaus (Abbildung 2.3-1) durchgeführt. Als Anregungsquelle wurde ein gepulster Argon-Ionen-Laser (*Sabre Innova Coherent*, $k_{rep} = 73.5 \text{ MHz}$ bei 496.5 nm) verwendet. Das Anregungslicht wurde über einen Strahlteiler (*AHF*, $Q 505 \text{ LP XR}$) in ein Wasserimmersions-Objektiv (*Olympus*, *UPLAPO 60* NA = 1.2) eingekoppelt. Der Fluoreszenzstrahl wird mit einem Polarisationssteiler in zwei Polarisationsebenen (parallel und senkrecht zur Polarisationsebene des Anregungslichts) getrennt. Jede der Polarisationsebenen wird wiederum mit einem Strahlteiler (*AHF*, $HQ 595 \text{ LP}$) in die spektrale Fenster grün (508-551 nm mit zusätzlichen Filter, (*AHF*, $HC 530/43$)) und rot (645-795 nm mit zusätzlichen Filter, (*AHF*, $HQ 720/150$)) aufgeteilt. Als Detektoren wurden vier Perkin-Elmer Einzelphotonendetektoren (*APD*, *SPCM-AQR-14*) verwendet. Die Signale der Detektoren wurden von zwei unabhängigen PC-Karten (*SPC-150*, Becker & Hickl) verarbeitet. Zusätzlich konnte der Fluoreszenzstrahl mit einem Klappspiegel vor der Lochblende, auf eine CCD Kamera (*CCD*, *DV887 ECS-BV*, Andor) umgelenkt werden.

3.3.3.6 Position des konfokalen Volumens im Detektionskanal

Die Position des konfokalen Volumens im Detektionskanal entlang der x-Achse wurde anhand von Reflexen des Laserlichts an PDMS/Wasser- oder PDMS/Luft-grenzflächen) in den 4 μm breiten Markierungen an der Seite des Detektionskanals bestimmt (Abbildung 3.3-2 Seite 166). Die Position des konfokalen Volumens im Detektionskanal entlang der y-Achse und z-Achse wurde ebenfalls anhand von Reflexen an PDMS/Wasser-Grenzflächen bzw. Glas/Wasser-Grenzflächen (Wände des Detektionskanals) ermittelt. Bei der Bestimmung der Position in x,y-Ebene kann anhand der Bosch-Prozess¹ bedingten Rauigkeit der Kanalwände [87] die Positionsgenauigkeit von $\approx 1 \mu\text{m}$ erwartet werden. Die Genauigkeit der Position entlang der z-Achse (Höhenposition) kann deutlich genauer mit einer Genauigkeit von $\approx 300 \text{ nm}$ (beugungsbegrenzt) bestimmt werden, da in dem Fall die glatte Oberfläche des Deckgläschen als Referenz genommen werden kann.

Bei mehreren Messungen mit der gleichen Mikromixer Zelle wurden die Position in x,y-Ebene nur einmal relativ zu den Markierungen bestimmt. Für alle weiteren Messungen wurden die Positionen mit Hilfe des Piezo-Scanners (Physik Instrumente, P-227) relativ zu der zuvor bestimmten Position ermittelt. Im Gegensatz zu der Position des konfokalen Volumens in x,y-Ebene wurde die Position entlang der z-Achse bei jeder Änderung der Position in x,y-Ebene, relativ zu der Glas/Wasser-Grenzfläche bestimmt.

3.3.3.7 Einfachere Konstruktion für die Einzelmolekülmessungen (MFD) unter Flussbedingungen (siehe Kapitel 3.3.4.2)

Aufgrund von relativ komplizierter Handhabung des oben beschriebenen Mikromixers wurde zusätzlich zum Mikromixer eine einfachere Konstruktion für die Durchführung der Einzelmolekülexperimente unter Flussbedingungen verwendet.

Die Konstruktion bestand aus einer kommerziell erwerbbaaren Probenkammer (*sticky-Slide I Luer*, Ibidi) mit einem rechteckigen Kanal mit den Maßen (Höhe x Breite x Länge) von 0.1 x 5.0 x 48 mm. Der Fluss in der Probenkammer wurde mittels unterschiedlichen Flüssigkeitsständen in den an beiden Enden des

¹ Als Bosch-Prozess wird das reaktive Silicium-Ionentiefenätzen Verfahren bezeichnet.

Kanals angeschlossenen Spritzen erzeugt. Die Genauigkeit bei der Messung der Flüssigkeitsstände betrug $\Delta h = 1 \text{ mm}$, was einen Fehler bei der Flussgeschwindigkeit von $\Delta u = 0.2 \text{ } \mu\text{m/ms}$ (bezogen auf Wasser bei 20°C) nach sich ziehen würde, wenn nur die Probenkammer mit dem entsprechenden hydrodynamischen Widerstand von $R_h = 0.117 \text{ kPa}\cdot\text{s/nL}$ (bezogen auf Wasser bei 20°C , siehe Gleichungen 3.3-7, 3.3-8 und 3.3-9) verwendet würde. Um den Fehler der Flussgeschwindigkeit zu minimieren, wurde zusätzlich eine Schleife bestehend aus einer runden Kapillare mit der Länge und dem Innendurchmesser von $l = 0.55 \text{ m}$ bzw. $r = 440 \text{ } \mu\text{m}$ zwischen dem Ausgang des Kanals und der Auslassspritze eingebaut.

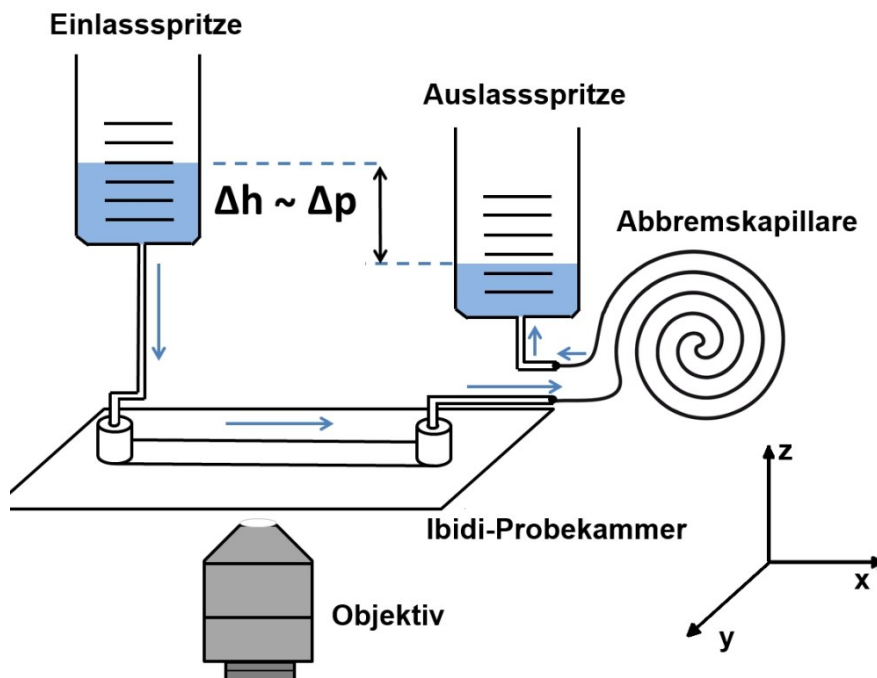


Abbildung 3.3-16 Konstruktion für die Erzeugung von Flussbedingungen bei Einzelmolekülexperimenten (siehe Kapitel 3.3.4.2).

Aufgrund des zusätzlichen hydrodynamischen Widerstands der Kapillare von $R_h = 0.6 \text{ kPa}\cdot\text{s/nL}$ (bezogen auf Wasser bei 20°C , siehe Gleichungen 3.3-4, 3.3-5, und 3.3-6) konnte die Flussgeschwindigkeit in der Konstruktion in dem Bereich von $u = 0.5\text{--}3 \text{ } \mu\text{m/ms}$ (entspricht einem Flüssigkeitsstanddifferenz von $\Delta h = 1\text{--}10 \text{ cm}$ mit einer maximalen Genauigkeit von $\Delta u = 0.03 \text{ } \mu\text{m/ms}$ eingestellt werden. Die tatsächliche Flussgeschwindigkeit im Kanal wurde mittels *FCS* während der jeweiligen Messung bestimmt (Kapitel 3.3.3.8).

3.3.3.8 Die Messungen der Flussgeschwindigkeit im Mikromixer mittels FCS

Alle FCS-Messungen im Mikromixer erfolgten am Fluoreszenzeinzelmolekülaufbau. Für die FCS-Messungen des Flusses im Mikromixer wurde eine Lösung des Fluorophors *Rhodamin 110* (*Rh 110*) in Wasser eingesetzt. Alle FCS-Messungen erfolgten entlang des Detektionskanals, wobei das konfokale Volumen grundsätzlich mittig im Detektionskanal in Bezug auf die Höhe und die Breite des Kanals platziert wurde (siehe Abbildung 3.3-5 und Abbildung 3.3-4). Die Position des konfokalen Volumens bezüglich der Breite und der Höhe des Detektionskanals wurde mittels der Lichtreflektion an den Wasser-Glas bzw. Wasser-PDMS Grenzfläche der Kanalwände bestimmt. Die Position entlang des Detektionskanals wurde hingegen mit Hilfe der Referenzmarken (siehe Abbildung 3.3-2) bestimmt. Für die Analyse der FCS-Daten wurde die FCS-Gleichung mit je einem Term für die Diffusion, für den 2-Dimensionales Fluss und für den Triplettzustand des Fluorophors verwendet (Gleichung 3.3-17). Im Falle einer Flussströmung in die x-Richtung des Detektionskanals ist die charakteristische Flusszeit t_f direkt mit der radialen Ausdehnung des konfokalen Volumens (ω_0) über die Gleichung 3.3-18 verknüpft [88]. Die Bestimmung der Größe des konfokalen Volumens wurde mittels bekannten Diffusionskoeffizienten des *Rh 110* durchgeführt ($D_{Rh110} = 4.4 \cdot 10^{-6} \pm 0.3 \text{ cm}^2/\text{s}$ bei der Temperatur von $T = 22.5^\circ \text{ C}$ [46]). Damit betrug die Ausdehnung des konfokalen Volumens $\omega_0 = 0.24 \pm 0.008 \text{ }\mu\text{m}$ und $z_0 \approx 1 \text{ }\mu\text{m}$ [89] in radiale und axiale Richtungen. Die Berücksichtigung der Ausdehnung des konfokalen Volumens zusammen mit dem Flussprofil im Detektionskanal (Kapitel 3.3.3.4) ergibt für die mittels FCS gemessene Flussgeschwindigkeit $u_{FCS} = u_{max} \cdot 0.99$ (u_{max} = maximale berechnete Flussgeschwindigkeit in der Mitte des Kanals.)

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \cdot \left(\frac{t_c}{t_d} \right)}} \right) \cdot G_f(t_c) \cdot G_T(t_c) \quad 3.3-17$$

$$G_T(t_c) = \left(1 - A_T + A_T \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_T}\right) \right)$$

$$G_f(t_c) = \exp \left(- \left(\frac{t_c}{t_f} \right)^2 \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \right)$$

$$u = \frac{\omega_0}{t_f} \quad 3.3-18$$

t_c = Korrelationszeit

t_d = Diffusionszeit (die Zeit, die ein frei diffundierendes Fluorophor braucht um das konfokale Volumen zu durchqueren)

t_f = Flusszeit (analog der Diffusionszeit)

u = Flussgeschwindigkeit

t_T = Triplettrelaxationszeit (analog der Diffusionszeit)

A_T = Triplettamplitude

ω_0/z_0 = Parameter, die das konfokale Messvolumen charakterisieren z_0 = Radius des Volumens entlang der z-Achse, ω_0 = Radius des Volumens in der x,y-Ebene)

3.3.4 Ergebnisse

3.3.4.1 Die Charakterisierung der Flussprofile und der Transporteigenschaften der Fluorophore mittels einer Kombination aus FCS-Messungen und CFD-Simulationen

Die FCS-Messungen der Flussgeschwindigkeit im Bereich des Detektionskanals mit dem vollentwickelten laminaren Strömungsprofil

Die mittels FCS-Messungen bestimmte Flussgeschwindigkeit im Bereich des Detektionskanals mit vollentwickelten laminaren Strömungsprofil (Abbildung 3.3-5 Abschnitt c Seite 169) stimmte exakt mit der mittels Gleichung 3.3-13 berechneten Flussgeschwindigkeit überein (Abbildung 3.3-17 B).

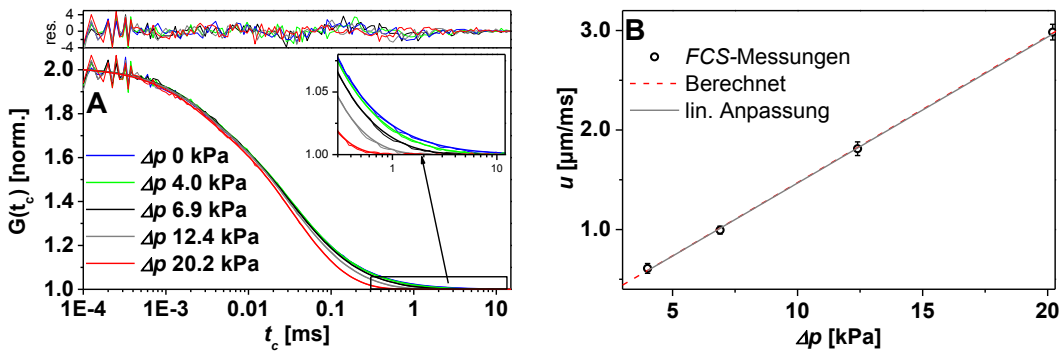


Abbildung 3.3-17 A: normierte FCS-Kurven von Rh 110 im Wasser bei verschiedenen Drücken (mit $\Delta p = \Delta p_S = \Delta p_M$), die in einem Abstand von $60\mu\text{m}$ von dem Mischungskanal entlang des Detektionskanals in der Mitte des Detektionskanals aufgenommen wurden (vergleiche Abbildung 3.3-5 Abschnitt c).

B: Auftragung der analytisch berechneten (Gleichung 3.3-13) Flussgeschwindigkeiten (rote gestrichelte Linie) und mittels FCS gemessenen (leere Punkte) Flussgeschwindigkeiten gegen die verwendete Druckdifferenz (mit $\Delta p = \Delta p_S = \Delta p_M$). Jeder leere Punkt repräsentiert einen Mittelwert über 5 FCS-Messungen bei der gleichen Druckdifferenz mit durch die Fehlerbalken repräsentierter Standardabweichung ($\sigma^2 \approx 5\%$). Die graue Linie repräsentiert lineare Anpassung an die gemessenen Datenpunkte.

Diese Übereinstimmung der mit Hilfe von FCS gemessenen und analytisch berechneten Flussgeschwindigkeiten, eröffnet die Möglichkeit, die berechneten Flussgeschwindigkeiten einzusetzen um mittels FCS-Messungen die Diffusionseigenschaften der Fluorophore zu untersuchen. Die analytisch nicht bestimmbar Abmessungen des konfokalen Volumens ist einer der wichtigsten Quellen für die systematische Abweichungen bei Bestimmung der Transporteigenschaften der Fluorophore mittels FCS [90-92]. Bei bekannter

Flussgeschwindigkeit kann die Bestimmung der Abmessungen des konfokalen Volumens umgangen werden, indem der Diffusionskoeffizient eines Fluorophors mit Hilfe der Gleichung 3.3-19 (Kombination aus Gleichung 3.3-18 und Gleichung 1.1-26 (Seite 17)) direkt aus der Steigung der linearen Auftragung von $t_f^2/(4 \cdot t_d)$ gegen u^2 berechnet wird.

$$u \cdot t_f = \sqrt{4 \cdot D \cdot t_d} \Rightarrow \frac{t_f^2}{4 \cdot t_d} = \frac{D}{u^2} \quad 3.3-19$$

t_d = Relaxationszeit des Korrelationsterms der Diffusion

t_f = Relaxationszeit des Korrelationsterms des Flusses

u = Flussgeschwindigkeit

D = Diffusionskoeffizient

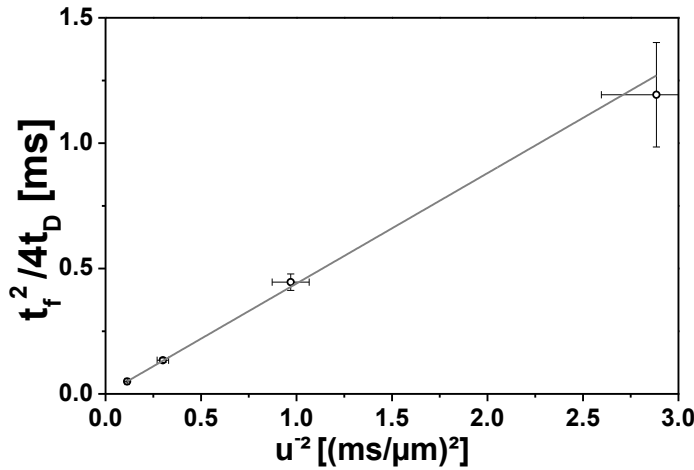


Abbildung 3.3-18 Die Auftragung von $t_f^2/(4 \cdot t_d)$ gegen u^2 . Die leeren Punkte repräsentieren einen Mittelwert über 5 FCS-Messungen bei der gleichen Flussgeschwindigkeit (Druckdifferenz) mit durch die Fehlerbalken der y-Achse repräsentierter Standardabweichung. Die Fehlerbalken der x-Achse repräsentieren maximale Abweichung der Flussgeschwindigkeit die aus der Bosch-Prozess bedingten Ungenauigkeit der Dimensionen der Kanäle des Mikromixers von $\pm 0.5 \mu\text{m}$ und der Genauigkeit der Druckbestimmung von $\pm 1\%$ resultieren (gesamt $\pm 5\%$).

Die graue Linie repräsentiert die lineare Anpassung an die gemessenen Datenpunkte. Die Steigung der linearen Anpassung entspricht hierbei dem Diffusionskoeffizienten des Fluorophors.

Der mittels der Auftragung von $t_f^2/(4 \cdot t_d)$ gegen u^2 berechnete Diffusionskoeffizient des Rh 110 von $D_{rh110} = 0.44 \cdot 10^{-6} \pm 0.04 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ entsprach genau dem in Literatur angegebenen Wert von $D_{lit} = 0.44 \cdot 10^{-6} \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ [46].

Die FCS-Messungen im Bereich mit dem nicht entwickelten laminaren Strömungsprofil

Bei Messungen nah an der Einmündung des Mischkanals in den Detektionskanal (Abbremsabschnitt des Detektionskanals Abbildung 3.3-5 Abschnitt b Seite 169), werden größere, systematische Abweichungen der mittels *FCS* bestimmten Flussgeschwindigkeiten von den mittels *CFD* berechneten Flussgeschwindigkeiten im Vergleich zu den Flussgeschwindigkeiten im Bereich mit dem vollentwickelten laminaren Strömungsprofil beobachtet (Abbildung 3.2-23 A). Der Grund dafür ist die ungenaue Position des konfokalen Volumens entlang der x-Achse im Detektionskanal, wobei diese Position nur einmal für jede Messreihe bestimmt wurde (Kapitel 3.3.3.6), was zu unterschiedlichen systematischen Verschiebungen der Flussgeschwindigkeiten bei verschiedenen Messreihen führte (Abbildung 3.2-23 A, C).

Eine aus diesem Grund auftretende systematische Abweichung der Flussgeschwindigkeit lässt sich berechnen, in dem die gemessene Änderung der Flussgeschwindigkeit mit der mittels *CFD* berechneten Änderung der Flussgeschwindigkeit verglichen wird. Unter Berücksichtigung der Genauigkeit der *FCS*-Messungen ($\sigma^2 \approx 5\%$ Fehlerbalken in Abbildung 3.2-23) kann mit Hilfe Gleichung 3.3-20 eine χ_r^2 -Fläche für die *FCS*-Messungen errechnet werden (Abbildung 3.2-23) deren Minimum die systematische Verschiebung der Position des konfokalen Volumens anzeigt (Abbildung 3.3-19).

$$\chi_r^2 = \sum_{-\Delta u}^{\Delta u} \sum_{-\Delta x}^{\Delta x} \sqrt{\frac{(u_{FCS} - u_{CFD}(\Delta u, \Delta x))^2}{\sigma^2}}, \quad 3.3-20$$

σ^2 = Standardabweichung der Flussgeschwindigkeit bei *FCS*-Messungen

u_{FCS} = Mittels *FCS* gemessene Flussgeschwindigkeit

u_{CFD} = Mittels *CFD* berechnete Flussgeschwindigkeit

Δx = systematische Abweichung der Position des konfokalen Volumens entlang der x-Achse (entlang des Detektionskanals)

Δu = zusätzliche systematische Abweichung der Flussgeschwindigkeit, die nicht auf die falsche Position des konfokalen Volumens entlang der x-Achse zurückzuführen ist.

Bei den Messungen wurde eine maximale Abweichung der Position des konfokalen Volumens von $\Delta x = 1.2 \mu\text{m}$ beobachtet (Abbildung 3.2-23 B). Eine daraus resultierende Abweichung der Flussgeschwindigkeit würde zu einem zusätzlichen

maximalen Fehler bei der Zeitauflösung des Mikromixers von $\pm 10\%$ ¹ führen, wenn die Messungen im Abstand von $10\text{ }\mu\text{m}$ vom Mischkanal entlang des Detektionskanals (Position x_{k0} Abbildung 3.3-5) durchgeführt werden.

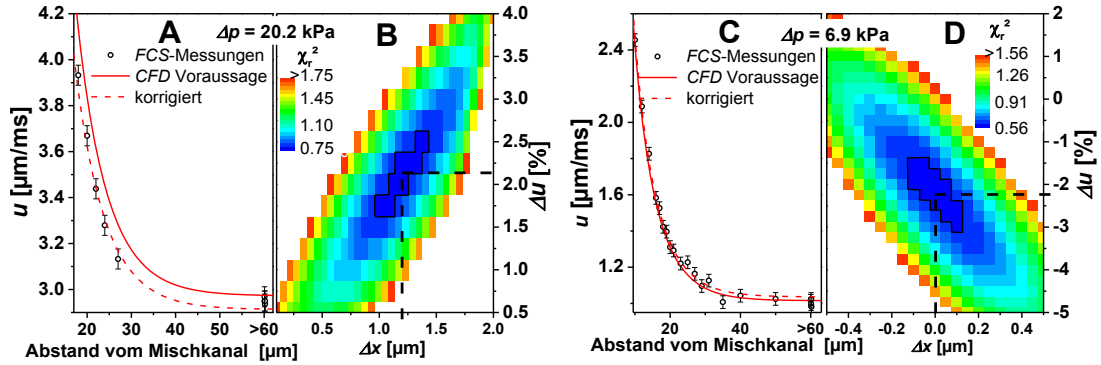


Abbildung 3.3-19 Die Flussgeschwindigkeiten im Abbremsabschnitt des Detektionskanals bei den Drücken von $\Delta p = \Delta p_S = \Delta p_M = 20.2\text{ kPa}$ (A) und $\Delta p = \Delta p_S = \Delta p_M = 6.9\text{ kPa}$ (B)

Die leeren Punkte repräsentieren *FCS*-Messungen. Die angezeigten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung berechnet aus 5 Messungen im Bereich des vollentwickelten laminaren Strömungsprofils. Die durchgezogenen roten Linien repräsentieren die dem eingestellten Druck entsprechende, mittels *CFD* berechnete Flussgeschwindigkeit. Die gestrichelten roten Linien repräsentieren die mittels *CFD* berechnete Flussgeschwindigkeit bei der die Minima der χ^2 -Flächen (B, D siehe auch Gleichung 3.3-20) zusätzlich berücksichtigt wurden. Die Abbildungsteile B und D zeigen die χ^2 -Flächen (siehe Gleichung 3.3-20) mit durch die schwarzen gestrichelten Linien markierten Minima. Die schwarzen Konturlinien umranden den Bereich um das Minimum mit einem Konfidenzniveau von 5 %.

Die Berücksichtigung des Minimums der χ^2 -Fläche und des Konfidenzniveaus von 5 % erlaubt es die Position des konfokalen Volumens entlang des Detektionskanals mit einer Genauigkeit von $\pm 0.250\text{ }\mu\text{m}$ zu bestimmen, was zu einer deutlichen Reduktion des Fehlers bei der Zeitauflösung des Mikromixers bis auf $\pm 2\%$ führt². Neben der systematischen Verschiebung der Flussgeschwindigkeit aufgrund der ungenauen Position des konfokalen Volumens konnte bei der Berechnung des Minimums der χ^2 -Flächen eine zusätzliche systematische Verschiebung der Flussgeschwindigkeit von $\pm 2\%$ beobachtet werden. Diese zusätzliche systematische Verschiebung der Flussgeschwindigkeit entspricht den Schwankungen der

¹ Diese Fehler wurden mit Hilfe der numerischen Simulationen (Kapitel 3.3.3.4) berechnet.

² Die genannten Zahlenwerte beziehen sich auf die in Abbildung 3.2-23 gezeigte Messreihen. Die tatsächliche Genauigkeit der Bestimmung der Position des konfokalen Volumens mittels der Minima der χ^2 -Flächen hängt von der Anzahl und der Genauigkeit der *FCS*-Messungen ab.

eingestellten Druckdifferenz, die aufgrund der Limitierung der Auflösung der verwendeten Manometer (Kapitel 3.3.3.1) nicht mehr detektiert werden konnten.

3.3.4.2 MFD-Messungen unter Flussbedingungen mit und ohne Additiv A-AZB-C

Bei den MFD-Messungen unter Flussbedingungen führt die aufgrund des Flusses verkürzte Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Detektionsvolumen zu einer verkürzten Beobachtungsdauer der Fluoreszenzbursts. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro Burst abnimmt.

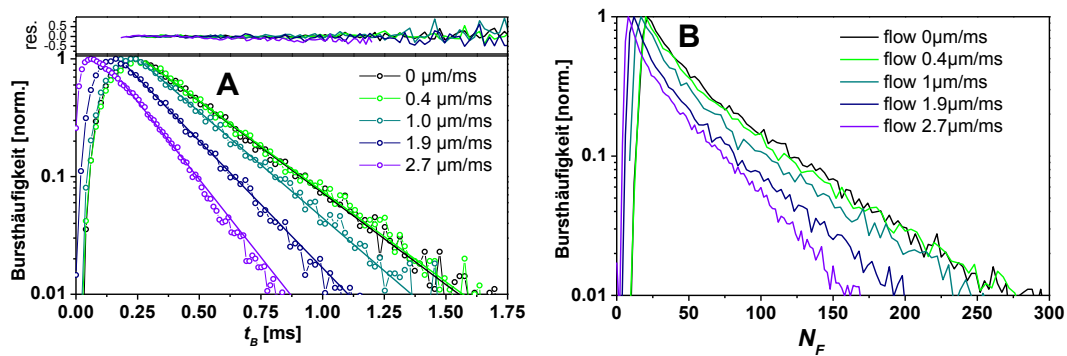


Abbildung 3.3-20 MFD-Messungen des *Rh 123* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) unter Flussbedingungen (Fluoreszenzaufbau Kapitel 3.3.3.5, Flusszelle Kapitel 3.3.3.7)

A) Die Verteilungen der Dauer der Fluoreszenzbursts bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten. Die durchgezogenen Linien repräsentieren eine monoexponentielle Anpassung an die Verteilungen. B) Die entsprechenden Verteilungen der Photonenzahl in den Fluoreszenzburst bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten.

Die gemessenen Verteilungen der Burstdauer (t_B), bei MFD-Messungen des *Rh 123* ohne Additive unter Flussbedingungen, sind in Abbildung 3.2-21 dargestellt. Die Verteilungen der Burstdauer lassen sich mit einer monoexponentiellen Funktion mit anpassen (Gleichung 3.3-21), wobei die Abklingkonstante $\langle t_B \rangle$ für die jeweilige Verteilungen der Burstdauer charakteristisch ist [7].

$$P(t_B) = A \cdot \exp(-t_B / \langle t_B \rangle) \quad 3.3-21$$

$P(t_B)$ = Bursthäufigkeit

t_B = Burstdauer

$\langle t_B \rangle$ = mittlere Burstdauer

A = Amplitude

Die Verteilungen der Fluoreszenzphotonenanzahl in Bursts, die ebenfalls in Abbildung 3.3-20 sind, können nicht mittels einfachen monoexponentiellen Funktion angepasst werden, deswegen werden diese Verteilungen mittels eines arithmetischen Mittelwertes $\langle N_F \rangle$ charakterisiert (Gleichung 3.3-22).

$$\langle N_F \rangle = \frac{\sum_{i=0}^i N_{Fi} \cdot N_{Bi}}{\sum_{i=0}^i N_{Bi}} \quad 3.3-22$$

Beide $\langle t_B \rangle$ und $\langle N_F \rangle$ für *MFD*-Messungen des *Rh 123* ohne Additive unter Flussgeschwindigkeiten, die für den in dieser Arbeit verwendeten Mikromixer typisch sind, sind in Abbildung 3.3-21 A abgebildet. Damit kann der Photonenverlust aufgrund des Flusses bei Einzelmolekülmessungen beschrieben werden. Diese Reduktion der Photonenzahl im Burst wird zwangsläufig dazu führen, dass bei höheren Flussgeschwindigkeiten die Selektion der Einzelmolekülereignisse nicht mehr möglich sein wird, da eine minimale Anzahl an Photonen nötig ist, um ein Einzelmolekülereignis aus einer Photonenspur zu selektieren (Kapitel 2.4). Darüber hinaus ist eine mittlere Anzahl der Photonen von $\langle N_F \rangle \geq 20$ [84] nötig, um das Fluoreszenzsignal im Burst analysieren zu können. Die durchgeführten *MFD*-Messungen des *Rh 123* zeigen (Abbildung 3.3-21), dass ab einer Flussgeschwindigkeit von $u > 4.5 \mu\text{m/ms}$ die genaue Analyse der Fluoreszenzburst aufgrund der unzureichenden Photonenzahl nicht mehr möglich sein wird. Damit wird der Flussgeschwindigkeitsbereich für den der Mikromixer konzipiert ist (3.3.2 Tabelle 3.3-1) zusätzlich durch die flussbedingte Reduktion der Photonenzahl im Fluoreszenzburst auf $0.4\text{-}4.5 \mu\text{m/ms}$ limitiert. Dies führt dazu, dass die maximale Zeitauflösung für die Messungen der Reaktionskinetiken im Mikromixer von $\tau_d = 1.8 \text{ ms}$ auf $\tau_d = 3 \text{ ms}$ verschlechtert wird (3.3.2 Tabelle 3.3-1).

In Abbildung 3.3-21 B ist die $\langle N_F \rangle$ bei *MFD*-Messungen des *Rh 123* mit und ohne Additive bei einer Flussgeschwindigkeit von $u = 2.7 \mu\text{m/ms}$ abgebildet, wobei die $\langle N_F \rangle$ von $\langle N_F \rangle = 38$ Photonen auf $\langle N_F \rangle = 157$ Photonen steigt, wenn Additiv *A-AZB-C* mit einer Konzentration von $[Q] = 400 \mu\text{M}$ verwendet wird und die Leistungsdichte von $\langle I \rangle = 25 \text{ kW/cm}^2$ auf $\langle I \rangle = 170 \text{ kW/cm}^2$ erhöht wird (siehe auch Tabelle 3.3-4).

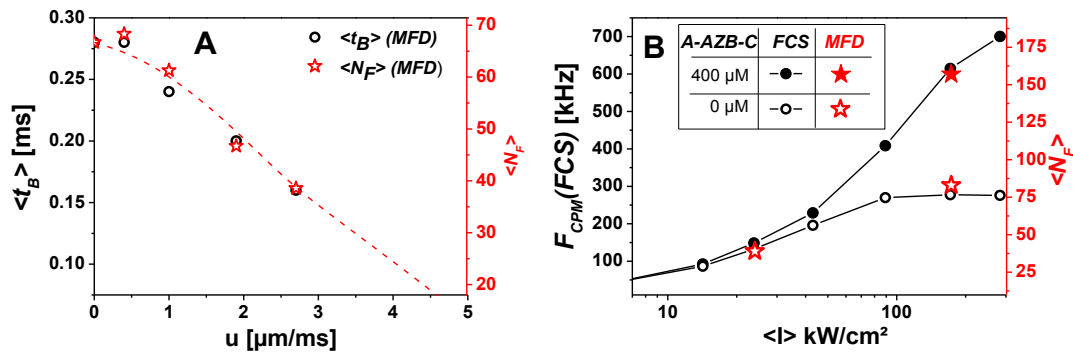


Abbildung 3.3-21 A) Die mittlere Dauer der Fluoreszenzburst $\langle t_B \rangle$ mit der entsprechenden mittleren Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro Burst $\langle N_F \rangle$ bei *MFD*-Messungen des *Rh 123* unter Flussbedingungen (Fluoreszenzaufbau Kapitel 3.3.3.5, Flusszelle Kapitel 3.3.3.7, Phosphatpuffer (25 mM pH 7)). Rote gestrichelte Linie repräsentiert den numerisch berechneten Verlauf von $\langle N_F \rangle$. B) Die mittels *FCS* gemessene Fluoreszenzzählrate des *Rh 123* (Kapitel 3.2.3.13) in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) bei gepulster Anregung (Kapitel 3.3.3.5) mit und ohne des Additivs *A-AZB-C*, zusammen mit der entsprechenden mittleren Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro Burst. Die *MFD*-Messungen wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von $u = 2.7 \mu\text{m/ms}$ durchgeführt.

Die Vervierfachung der $\langle N_F \rangle$ mit Hilfe des Additivs *A-AZB-C* hat zur Folge, dass die flussbedingte Verringerung der Photonenzahl in Bursts nicht mehr den Flussgeschwindigkeitsbereich für den der Mikromixer konzipiert ist (Kapitel 3.3.2 Tabelle 3.3-1) zusätzlich limitiert, was Messungen von schnelleren Reaktionskinetiken im Mikromixer möglich macht.

Tabelle 3.3-4 Die mittlere Anzahl der Fluoreszenzphotonen $\langle N_F \rangle$ im Bursts bei *MFD*-Messungen des *Rh 123* mit und ohne Additiv *A-AZB-C* bei Flussgeschwindigkeiten

u [μm/ms]	$\langle I \rangle = 24 \text{ kW/cm}^2$	$\langle I \rangle = 170 \text{ kW/cm}^2$ (+400 μM <i>A-AZB-C</i>)
0	67	128 (278)
0.4	68	
1	61	
1.9	47	
2.7	38	84 (157)

4 Zusammenfassung

4.1 OPV als molekularer Kraftsensor

Das Fluoreszenzsignal eines Oligophenylenvinylenderivats (*OPV 5*) mit um etwa 40 ° gegeneinander verdrehten Phenylringen wurde auf seine Eignung als ein Deformations- oder Kraftsensor in einer Polymermatrix untersucht. Dafür wurde *OPV 5* und *Rh 123* jeweils in einer Polyvinylchlorid (*PVC*) Folie gelöst, wobei *Rh 123* als Referenz verwendet wurde, da er ein starres molekulares Gerüst aufweist. Die Fluoreszenzlebensdauer, Fluoreszenzanisotropie und Verschiebung des Fluoreszenzspektrums von *OPV 5* bzw. von *Rh 123* wurden gemessen, während mit Farbstoff dotierte *PVC*-Folien unter definierter Zugspannung gedehnt wurden. Bei beiden Farbstoffen wurde eine identische Änderung der Fluoreszenzanisotropie beobachtet, die auf eine Änderung der Ausrichtung der Farbstoffmoleküle zurückzuführen ist. Eine kraftspezifische Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer um 25 ps und eine Blauverschiebung des Fluoreszenzemissionsspektrums um 1.2 nm sind dagegen nur bei *OPV 5* beobachtet worden. Diese beiden Effekte konnten auf die Wirkung der mechanischen Kraft auf das im S_0 - und S_1 -Zustand unterschiedlich verdrillte Molekülgerüst von *OPV 5* zurückgeführt werden.

Sowohl die Verkürzung der Lebensdauer als auch die Blauverschiebung des Fluoreszenzemissionsspektrums von *OPV 5* konnten durch entsprechende semiempirische quantenmechanische Simulationen bestätigt werden (Dr. A. Koslowski MPI für Kohlenforschung Mülheim a.d.R.).

4.2 Optimierung des Fluoreszenzsignals und der Photostabilität von Fluorophoren

4.2.1 Additive zur Steigerung der Signalstärke von Rhodamin 110

Die Untersuchung der fluoreszenzsignalsteigernden Wirkung von drei chemischen Additiven auf den Fluorophor *Rhodamin 110* (*Rh 110*) wurde mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*FCS*) und der Analyse der leistungsdichte-

abhängigen Fluoreszenzintensität durchgeführt. Bei den Additiven handelte es sich um:

- 4-[(4-Aminophenyl)diazenyl]benzoesäure (*A-AZB-C*)
- 4-(Phenylazo)-benzoesäure (*AZB-C*)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (*Trolox*)

Für die Analyse der experimentell gewonnenen Daten wurde ein kinetisches Modell des Fluorophors mit allen relevanten elektronischen Zuständen bzw. chemischen Spezies (Triplett-, Radikalkation-, Radikalanion-, Singulettzustände und Produkte einer irreversiblen Photozerstörungsreaktion) entwickelt. Mit Hilfe dieses Modells war es möglich die *FCS*- und Fluoreszenzintensitätsmessungen zu analysieren und das komplette Fluoreszenzverhalten des Fluorophors und die Effekte der Additive quantitativ zu beschreiben.

Beim *Rh 110* in luftgesättigter wässriger Lösung werden hauptsächlich Radikalkationzustand und Triplettzustand besetzt, so dass die simultane Löschung dieser beiden Zustände durch das Additiv *A-AZB-C* zur größten Fluoreszenzzählratensteigerung geführt hat. Bei einer Anregungsleistungsdichte von 1 MW/cm² bewirkte die Gegenwart von 600 µM *A-AZB-C* eine mehr als zehnfache Steigerung der maximalen Fluoreszenzzählrate pro Molekül auf bis zu 2.4 MHz gegenüber *Rh 110* ohne Additive. Die Löschung des Triplettzustands fiel in Gegenwart der Additive *AZB-C* und *A-AZB-C* gleich stark aus. Gleichzeitig konnte das Additiv *AZB-C* lediglich sehr schwach den Radikalkationzustand des *Rh 110* beeinflussen, wobei die Löschung des Radikalkationzustands in diesem Fall hauptsächlich aufgrund der Reaktion des angeregten Radikalkationzustands mit dem Additiv stattfinden kann. Dadurch konnte nur eine wesentlich kleinere Steigerung der Fluoreszenzzählrate in Gegenwart von *AZB-C* im Vergleich zu *A-AZB-C* beobachtet werden. Bei einer Anregungsleistungsdichte von 1 MW/cm² bewirkte die Konzentration von 800 µM *AZB-C* eine sechsfache Steigerung der Fluoreszenzzählrate pro Molekül. In Gegenwart des Additivs *Trolox* wurde ähnlich wie in Gegenwart des *A-AZB-C* eine starke Löschung des Radikalkationzustands beobachtet, wobei *Trolox* gleichzeitig in der Lage war den angeregten Singulettzustand des *Rh 110* zu oxidieren und die angeregten Singulett- und Triplettzustände zu reduzieren. Daher konnte in Gegenwart von *Trolox* eine starke

Besetzung des Radikalanionzustands beobachtet werden. Die Fluoreszenzzählratensteigerung in Gegenwart von *Trolox* fiel dementsprechend ähnlich stark aus wie beim *AZB-C*.

Der in Gegenwart von *Trolox* verstärkt besetzte Radikalkationzustand konnte durch das Additiv *AZB-C* stark depopuliert werden. Dadurch wurde eine ähnlich starke Steigerung der Fluoreszenzzählrate in Gegenwart einer *Trolox/AZB-C-Mischung* mit einem Konzentrationsverhältnis von $[Q]_{\text{Trolox}}/[Q]_{\text{AZB-C}}=200/800 \mu\text{M}$ wie die in Gegenwart von $600 \mu\text{M}$ *A-AZB-C* beobachtet.

4.2.2 Die Messungen der Photozerstörung von Rhodamin 123

Die Untersuchung der Photozerstörung des *Rh 123* bei niedrigen Anregungsleistungen von 14 W/cm^2 zeigte, dass in luftgesättigter wässriger Lösung die Photozerstörung des *Rh 123* hauptsächlich aus dem ersten angeregten Singulettzustand mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_{bS} \approx 100 \text{ s}^{-1}$ erfolgt. Aus dem Triplettzustand erfolgte Photozerstörung mit einer deutlich kleineren Geschwindigkeitskonstante von $k_{bT} \approx 30 \text{ s}^{-1}$. Dabei zeigte sich, dass der Radikalkationzustand trotz seiner langen Lebensdauer nicht in die Photozerstörung des *Rh 123* involviert ist. Die dominierende Rolle des Singulettzustands bei der Photozerstörung führt dazu, dass die Dunkelzustände löschende Additive lediglich einen geringen Einfluss auf die Photostabilität des *Rh 123* haben. So wurde beim Einsatz der Additive *A-AZB-C* bzw. *AZB-C* $[Q] > 100 \mu\text{M}$ eine maximale Steigerung der Photostabilität des *Rh 123* von 30 % beobachtet.

Unter sauerstofffreien Bedingungen ist die Population des T_1 -Zustands etwa 35 mal höher im Vergleich zu unter sauerstofffreien Bedingungen. Dadurch führt bereits ein niedriger Wert für die Konstante der Photozerstörung aus dem Triplettzustand ($k_{bT} = 3 \text{ s}^{-1}$) zu einer beschleunigten Photozerstörung des *Rh 123* mit einer summierten Geschwindigkeitskonstante von $k_{btot} = 360 \text{ s}^{-1}$ (im Vergleich zu $k_{btot} = 150 \text{ s}^{-1}$ im luftgesättigten Puffer). Gleichzeitig führt die Anwesenheit von geringen Konzentrationen eines triplettlöschenden Additivs zu einer starken Verlangsamung der Photozerstörung. Bei einer Konzentration des Additivs *AZB-C* von $c = 100 \mu\text{M}$ wurde unter sauerstofffreien Bedingungen die Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung von $k_{btot} = 6 \text{ s}^{-1}$ beobachtet, was

einer 60-fachen Steigerung der Photostabilität entspricht. Ein Vergleich zwischen den Messungen im luftgesättigten und sauerstofffreien Puffer mit einer Additivkonzentration (*A-AZB-C* oder *AZB-C*) von $[Q] = 100 \mu\text{M}$ ergibt eine mindestens 10-fach größere Photostabilität bei sauerstofffreien Bedingungen.

4.3 Optimierung des Fluoreszenzsignals unter Flussbedingungen

Der Farbstoff *Rh 110* wurde eingesetzt, um Flussprofile in den Kanälen eines mikrofluidischen Mixers (Mikromixer) mittels *FCS* zu charakterisieren. Die Charakterisierung der Strömungsprofile in den Mikrokanälen mittels *FCS* erfordert eine Vielzahl von einzelnen *FCS*-Messungen. Deswegen wurde zusätzlich zu den *FCS*-Messungen die in den Kanälen des Mikromixers vorherrschende laminare Strömung mittels Strömungssimulationen (*CFD*, eng. Computational fluid dynamics) bestimmt. Die aus Strömungssimulationen resultierende Kenntnis der Flussprofile in Kombination mit *FCS*-Messungen wurde dazu verwendet, um den Diffusionskoeffizienten des *Rh 110* exakt zu ermitteln, was mittels Einfokus-*FCS*-Messungen allein nicht möglich wäre.

Ähnlich wie bei einer Continuous Flow Anlage entspricht die Position des Detektionsvolumens in den Kanälen des Mikromixers bei gegebenem Fluss der vergangen Zeit nach der Mischung. Dementsprechend bestimmt die Unsicherheit bei der Bestimmung der Position des Detektionsvolumens die Unsicherheit der Zeitauflösung des Mikromixers. In diesem Zusammenhang wurden die numerisch berechneten Flussprofile in Kombination mit mittels *FCS* gemessenen Flussgeschwindigkeiten dazu verwendet um die Position des Detektionsvolumens exakt zu ermitteln. Dabei konnten die Unsicherheiten der berechneten Zeitauflösung auf ein Fünftel reduziert werden.

Der Fluss im Mikromixer verkürzt die Verweildauer der Fluorophore im Detektionsvolumen bei Einzelmolekülfluoreszenzmessungen, was eine Verringerung der detektierten Fluoreszenzphotonenzahl zur Folge hat. Diese Verringerung der Fluoreszenzphotonenzahl schränkt den Einsatzbereich des Mikromixers bei Einzelmolekülmessungen ein. Die flussbedingte Verringerung der Fluoreszenzphotonenzahl führt dazu, dass ab einer Flussgeschwindigkeit von

4 $\mu\text{m/ms}$ keine Einzelmolekülfluoreszenzmessungen mehr möglich sind. Diese zusätzliche Limitierung der Flussgeschwindigkeit führt zu einer Verschlechterung der maximal möglichen Zeitauflösung des Mikromixers von 1.8 ms auf 3 ms. In diesem Zusammenhang konnte bei Einzelmolekülmessungen von *Rhodamin 123* (*Rh 123*) unter Flussbedingungen das Additiv *A-AZB-C* eingesetzt werden, um den flussbedingten Fluoreszenzphotonenverlust zu kompensieren. Bei einer Anregungsleistungsdichte von 170 kW/cm^2 führte der Einsatz von 400 μM *A-AZB-C* zur Vervierfachung des Fluoreszenzsignals von *Rh 123*, so dass die maximale Zeitauflösung des Mikromixers bei den Einzelmolekülfluoreszenzmessungen nicht mehr durch die flussbedingte Verringerung der detektierten Fluoreszenzphotonenzahl limitiert war.

X_{eq} ist die Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustands X im Gleichgewicht

Umstellen von Gleichung 5.1-2 nach $R_{eq}^{\bullet+}$ ergibt Gleichung 5.1-5

$$R_{eq}^{\bullet+} = ST_{eq} \cdot \frac{k_{ox\text{tot}}' + k_{diff}' + k_{bST\text{tot}}'}{k_{red\text{tot}}'} - \frac{k_{diff}'}{k_{red\text{tot}}'} \quad 5.1-5$$

Einsetzen von Gleichungen 5.1-5 und 5.1-4 in Gleichung 5.1-3 ergibt Gleichung 3.2-30

$$ST_{eq} = \frac{k_{diff}' \cdot \left(1 + \frac{k_{bR+\text{tot}}'}{k_{red\text{tot}}'} + \frac{k_{diff}'}{k_{red\text{tot}}'}\right)}{\frac{k_{ox\text{tot}}' + k_{diff}' + k_{bST\text{tot}}'}{k_{red\text{tot}}'} \cdot (k_{bR+\text{tot}}' + k_{diff}') + k_{diff}' + k_{bST\text{tot}}'} \quad (\text{Gleichung 3.2-30})$$

Für den Gleichgewichtszustand zwischen ST und $R^{\bullet+}$ (Abbildung 3.2-17 B) unter der Bedingung, dass die Photozerstörung vernachlässigbar klein ist [24], gelten folgende Differentialgleichungen:

$$\frac{dR_{eq}^{\bullet+}}{dt} = \left(ST_{eq} \cdot k_{ox\text{tot}}' - R_{eq}^{\bullet+} \cdot k_{red\text{tot}}' - R_{eq}^{\bullet+} \cdot k_{diff}' \right) = 0 \quad 5.1-6$$

$$\frac{dST_{eq}}{dt} = \left(R_{eq}^{\bullet+} \cdot k_{red\text{tot}}' + k_{diff}' - ST_{eq} \cdot k_{ox\text{tot}}' - ST_{eq} \cdot k_{diff}' \right) = 0 \quad 5.1-7$$

$$ST_{eq} + R_{eq}^{\bullet+} = 1 \quad 5.1-8$$

Das System der linearen Gleichungen ist eindeutig lösbar mit der Lösung für ST_{eq} :

$$ST_{eq} = \frac{k_{redtot}' + k_{diff}}{k_{redtot}' + k_{oxtot}' + k_{diff}} \quad (\text{Gleichung 3.2-32})$$

5.1.2 Herleitung der Relaxationszeiten und Amplituden des Radikalkationterms des Radikalkation-Targetfits (Modell 1b Kapitel 3.2.4.3)¹

Bei der Herleitung wird die Photozerstörung nur aus dem Radikalkationenzustand mit der Geschwindigkeitskonstante k_{bR+tot} berücksichtigt, somit gelten für den Gleichgewichtszustand zwischen ST und $R^{\bullet+}$ (Abbildung 3.2-17 B) folgende Differentialgleichungen:

$$\frac{dR_{eq}^{\bullet+}}{dt} = (ST_{eq} \cdot k_{oxtot}' - R_{eq}^{\bullet+} \cdot (k_{redtot}' + k_{diff} + k_{bR+tot}')) = 0 \quad 5.1-9$$

$$\frac{dST_{eq}}{dt} = (R_{eq}^{\bullet+} \cdot k_{redtot}' + k_{diff} - ST_{eq} \cdot k_{oxtot}' - ST_{eq} \cdot k_{diff}) = 0 \quad 5.1-10$$

$$\frac{dP_{eq}}{dt} = (-P_{eq} \cdot k_{diff} + R_{eq}^{\bullet+} \cdot k_{bR+tot}') = 0 \quad 5.1-11$$

$$ST_{eq} + R_{eq}^{\bullet+} + P_{eq} = 1 \quad 5.1-12$$

¹ Die Analytische Beschreibung der Amplitude (Gleichung 3.2-34) und der Relaxationszeit des Radikalkationterms (Gleichung 3.2-36) wurden von Stanislav Kalinin in Zusammenarbeit mit Daniela Pffiffi im Rahmen des Sonderforschungs-Bereichs 663 A8 hergeleitet. Weil die beiden Gleichungen essentiell für die Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit präsentierten FCS-Messungen sind (Kapitel 3.2.4.3, Kapitel 3.2.6.3 und 3.2.7), wird die Herleitung der beiden Gleichungen kurz in diesem Kapitel beschrieben.

X_{eq} ist die Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustands X im Gleichgewicht

Umformen der Gleichung 5.1-12 nach ST_{eq} und Einsetzen in die Gleichung 5.1-10 (in den Ausdruck „ $ST_{eq} \cdot k_{diff}$ “) ergibt Gleichung 5.1-13:

$$\frac{dST_{eq}}{dt} = \left(-ST_{eq} \cdot k_{oxtot}' + R_{eq}^{\bullet+} \cdot (k_{redtot}' + k_{diff}) + P_{eq} \cdot k_{diff} \right) \quad 5.1-13$$

Damit lassen sich die Gleichung 5.1-13, Gleichung 5.1-9 und Gleichung 5.1-11 in Matrixform schreiben:

$$\begin{pmatrix} \frac{dST_{eq}}{dt} \\ \frac{dR_{eq}^{\bullet+}}{dt} \\ \frac{dP_{eq}}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{oxtot}' & k_{redtot}' + k_{diff} & k_{diff} \\ k_{oxtot}' & -k_{redtot}' - k_{diff} - k_{bR+tot}' & 0 \\ 0 & k_{bR+tot}' & k_{diff} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} ST_{eq} \\ R_{eq}^{\bullet+} \\ P_{eq} \end{pmatrix} \quad 5.1-14$$

Unter den Gleichgewichtsbedingungen gilt:

$$\det \begin{pmatrix} -k_{oxtot}' - \lambda & k_{redtot}' + k_{diff} & k_{diff} \\ k_{oxtot}' & -k_{redtot}' - k_{diff} - k_{bR+tot}' - \lambda & 0 \\ 0 & k_{bR+tot}' & k_{diff} - \lambda \end{pmatrix} = 0 \quad 5.1-15$$

damit folgt

$$\begin{aligned} \lambda^2 + \lambda \cdot (2 \cdot k_{diff} + k_{redtot}' + k_{bR+tot}' + k_{oxtot}') + (k_{diff}^2 + k_{diff} \cdot k_{redtot}' + k_{diff} \cdot k_{bR+tot}' \\ + k_{diff} \cdot k_{bR+tot}' + k_{diff} \cdot k_{oxtot}' + k_{bR+tot}' \cdot k_{oxtot}') = 0 \end{aligned} \quad 5.1-16$$

Die Lösung der Gleichung 5.1-16 ergibt für λ Gleichung 3.2-35:

$$\lambda_{1,2} = -k_{diff} + \frac{1}{2} \left(-k_{redtot} - k_{oxtot} - k_{bR+tot} \pm X \right) \quad (\text{Gleichung 3.2-35})$$

mit

$$X = \sqrt{k_{redtot}^2 + k_{oxtot}^2 + k_{bR+tot}^2 - 2 \cdot k_{oxtot} \cdot k_{bR+tot} + 2 \cdot k_{oxtot} \cdot k_{redtot} + 2 \cdot k_{redtot} \cdot k_{bR+tot}}$$

Damit ist eine Korrelationsfunktion $G_{R+,D}(t_c)$ mit einem Radikalkationterm und einem Diffusionsterm durch die Gleichung 5.1-17 gegeben.

$$G_{R+,D}(t_c) = 1 + A_1 \cdot \exp(\lambda_1 \cdot t_c) + A_2 \cdot \exp(\lambda_2 \cdot t_c) \quad 5.1-17$$

Ausklammern von $\exp(-t_c \cdot k_{diff})$ führt zu der Gleichung 5.1-18

$$G_{R+,D}(t_c) = \left(1 + \exp(-t_c \cdot k_{diff}) \right) \cdot \left[A_1 \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_{R1+}}\right) + A_2 \cdot \exp\left(-\frac{t_c}{t_{R2+}}\right) \right] \quad 5.1-18$$

Die Gleichung 5.1-18 repräsentiert eine Gleichung mit zwei unabhängigen Korrelationstermen. Dabei entspricht der Term in eckigen Klammern dem Radikalkationterm mit zwei Relaxationszeiten t_{R1+} und t_{R2+} , die mit Hilfe von Gleichung 5.1-19 bzw. Gleichung 5.1-20 berechnet werden können.

$$t_{R1+} = -1/(\lambda_1 + k_{diff}) \quad 5.1-19$$

$$t_{R2+} = -1/(\lambda_2 + k_{diff}) \quad 5.1-20$$

Bei FCS-Messungen mit dem im Kapitel 2.4.1 beschriebenen Detektionsvolumen können Prozesse mit Relaxationszeiten von $t > 1\text{ms}$ vernachlässigt werden. Gleichzeitig wird bei für t_{R1+} für *Rh 110* typischen Geschwindigkeitskonstanten ein großer Wert erwartet ($t_{R1+} > 1\text{ms}$), deswegen gilt bei FCS-Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, die Gleichung 3.2-36.

$$t_{R+} \approx t_{R2+} = -1/(\lambda_2 + k_{diff}) \quad (\text{Gleichung 3.2-36})$$

Die Herleitung von Amplitude erfolgt auf gleiche Weise, wobei dafür folgende Anfangsbedingungen benötigt werden:

$$\frac{dR_{eq}^{*+}}{dt} = 0, \quad \frac{dP_{eq}}{dt} = 0, \quad \frac{dST_{eq}}{dt} = 1$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -S_{1eq} \cdot (k_{diff} + k_0' + k_{oxStot}' + k_{bStot}') + S_{0eq} \cdot k_{01} = 0 \quad 5.1-22$$

mit $k_0' = k_{ISC} + k_{IC} + k_F + k_{qS} \cdot [Q]$

$$\frac{dT_1}{dt} = -T_{1eq} \cdot (k_T' + k_{diff} + k_{oxTtot}' + k_{bTtot}') + S_{1eq} \cdot k_{ISC} = 0 \quad 5.1-23$$

$$\frac{dR^{\bullet+}}{dt} = -R_{eq}^{\bullet+} \cdot (k_{redtot}' + k_{diff} + k_{bRtot}') + T_{eq} \cdot k_{oxTtot}' + S_{1eq} \cdot k_{koxStot}' = 0 \quad 5.1-24$$

$$\frac{dP}{dt} = -P_{eq} \cdot k_{diff} + R_{eq}^{\bullet+} \cdot k_{bRtot}' + T_{1eq} \cdot k_{bTtot}' + S_{1eq} \cdot k_{bStot}' = 0 \quad 5.1-25$$

$$T_{1eq} + R_{eq}^{\bullet+} + S_{0eq} + S_{1eq} + P_{eq} = 1 \quad 5.1-26$$

Gleichung 5.1-22 umformen nach $S_{0eq} \rightarrow$

$$S_{0eq} = K_{S0} \cdot S_{1eq}$$

$$\text{mit, } K_{S0} = \frac{k_{diff} + k_0' + k_{oxStot}' + k_{bStot}'}{k_{01}} \quad (\text{Gleichung 3.2-13})$$

Gleichung 5.1-23 umformen nach $T_{1eq} \rightarrow$

$$T_{1eq} = K_{T1} \cdot S_{1eq}$$

$$\text{mit, } K_{T1} = \frac{k_{ISC}}{k_T' + k_{diff} + k_{oxTtot}' + k_{bTtot}'} \quad (\text{Gleichung 3.2-14})$$

Gleichung 3.2-14 einsetzen in 5.1-24 und umformen nach $R_{eq}^{\bullet+} \rightarrow$

$$R_{eq}^{\bullet+} = K_{R+} \cdot S_{1eq}$$

(Gleichung 3.2-15)

$$\text{mit, } K_{R+} = \frac{K_{T1} \cdot k_{oxTtot}' + k_{koxStot}'}{k_{redtot}' + k_{diff} + k_{bRtot}'}$$

Gleichungen 3.2-14 und 3.2-15 einsetzen in 5.1-25 umformen nach $P_{eq} \rightarrow$

$$P_{eq} = K_P \cdot S_{1eq}$$

(Gleichung 3.2-16)

$$\text{mit, } K_P = \frac{k_{bStot}' + K_{R+} \cdot k_{bRtot}' + K_{T1} \cdot k_{bTtot}'}{k_{diff}}$$

Gleichungen 3.2-13, 3.2-14, 3.2-15, 3.2-16 einsetzen in 5.1-26 und umformen nach $S_{1eq} \rightarrow$

$$S_{1eq} = \frac{1}{1 + K_{S0} + K_{T1} + K_{R+} + K_P}$$

(Gleichung 3.2-17)

5.1.4 Das Modell mit dem Radikalkation und Radikalanion

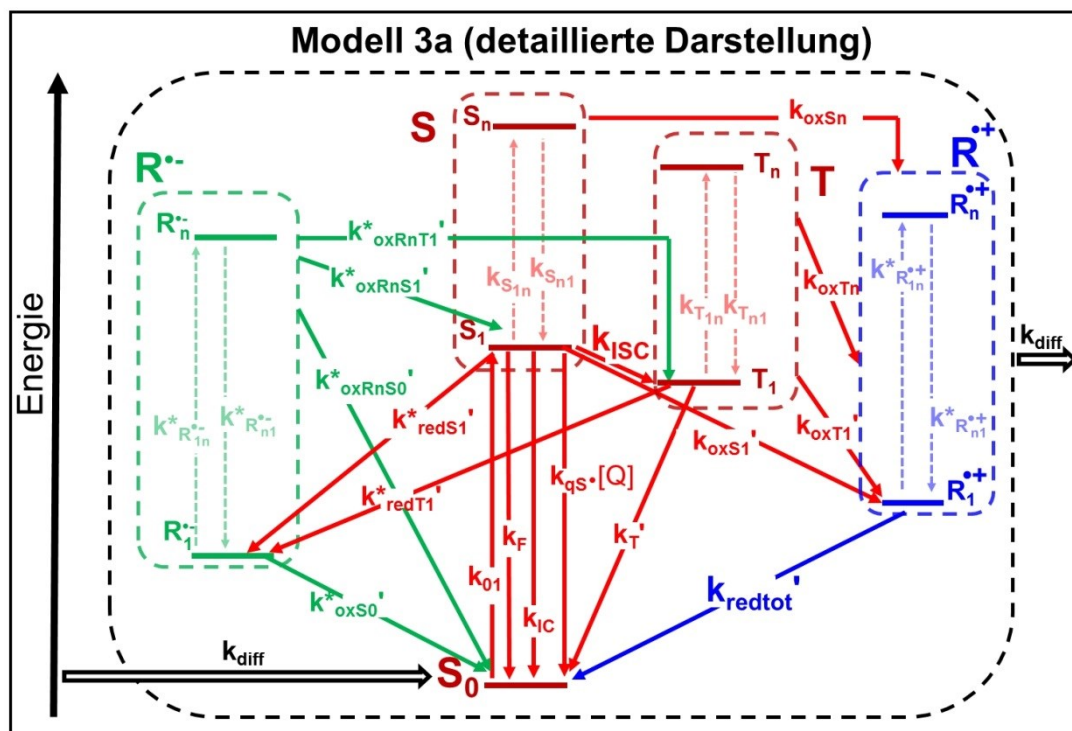


Abbildung 5.1-1 Elektronisches Modell mit Radikalkation-, Radikalanion-, Triplett- und Singulett-Zuständen sowie der Diffusion. Durchgezogene Pfeile repräsentieren alle für die nachfolgende Herleitung relevanten Prozesse. Die gestrichelten Pfeile repräsentieren Prozesse die für das gesamte Modell notwendig sind, deren Geschwindigkeitskonstanten aber nicht im Rahmen dieser Arbeit genau bestimmt werden können. Damit die Abbildung übersichtlich bleibt wird bei der Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten, die eine Form $k_{xp} \cdot \langle I \rangle$ haben, auf $\langle I \rangle$ verzichtet.

Das kinetische Modell mit Singulett-, Triplett-, Radikalkation- und Radikalanionzuständen sowie Diffusion (Abbildung 5.1-1 siehe auch Abbildung 3.2-29) wird vereinfacht indem die höher angeregten Zustände jeweils mit den direkt darunter liegenden Zuständen zu einem entsprechenden Zustand ($R^{\bullet+} = R_I^{\bullet+} + R_n^{\bullet+}$, $T = T_I + T_n$, $S = S_I + S_n$, $R^{\bullet-} = R_I^{\bullet-} + R_n^{\bullet-}$) zusammengefasst werden (vergl. Kapitel 3.2.4.1).

Die Oxidation des Anionenzustands kann in die Zustände S_0 , S_I und T_I führen. Die Oxidation und die Reduktion des Fluorophors können aus den Zuständen S_I und T_I erfolgen. Die Reduktion des Radikalkations führt nur in den Zustand S_0 , weil die Reduktion des höher angeregten Radikalkationenzustands mit der Geschwindigkeitskonstante k_{qRn+} vernachlässigt wird (Kapitel 3.2.6.1). Unter Gleichgewichtsbedingungen gelten für die Änderungen der Besetzungen der jeweiligen Zustände folgende Differentialgleichungen:

$$\frac{dR^{\bullet+}}{dt} = -R_{eq}^{\bullet+} \cdot (k_{redtot}' + k_{diff}) + T_{eq} \cdot (k_{oxT1}' + k_{oxTn} \cdot <I>) \quad 5.1-27$$

$$+ S_{1eq} \cdot (k_{koxS1}' + k_{koxSn} \cdot <I>) = 0$$

$$\frac{dR^{\bullet-}}{dt} = -R_{eq}^{\bullet-} \cdot (k_{diff} + k_{oxS0}' + (k_{oxRnS0}' + k_{oxRnS1}' + k_{oxRnT1}') \cdot <I>) \quad 5.1-28$$

$$+ T_{1eq} \cdot k_{redT1}' + S_{1eq} \cdot k_{redS1}' = 0$$

$$\frac{dS_0}{dt} = -S_{0eq} \cdot (k_{01} + k_{diff}) + k_{diff} + R_{eq}^{\bullet+} \cdot k_{red}' \quad 5.1-29$$

$$+ T_{1eq} \cdot k_T' + S_{eq} \cdot (k_F + k_{IC} + k_{qS} \cdot [Q]) + R_{eq}^{\bullet-} \cdot (k_{oxS0}' + k_{oxRnS0}' \cdot <I>) = 0$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -S_{1eq} \cdot (k_{koxS1}' + k_{koxSn} \cdot <I> + k_{redS1}' + k_{diff} + k_0') \quad 5.1-30$$

$$+ S_{0eq} \cdot k_{01} + R_{eq}^{\bullet-} \cdot k_{oxRnS1}' \cdot <I> = 0$$

$$\text{mit } k_0' = k_{ISC} + k_{IC} + k_F + k_{qS} \cdot [Q]$$

$$\frac{dT_1}{dt} = -T_{1eq} \cdot (k_T' + k_{redT1}' + k_{diff} + (k_{oxT1}' + k_{oxTn} \cdot <I>)) \quad 5.1-31$$

$$+ S_{1eq} \cdot k_{ISC} + R_{eq}^{\bullet-} \cdot k_{oxRnT1}' \cdot <I> = 0$$

$$T_{1eq} + R_{eq}^{\bullet+} + R_{eq}^{\bullet-} + S_{0eq} + S_{1eq} = 1 \quad 5.1-32$$

Gleichung 5.1-31 umformen nach $T_{1eq} \rightarrow$

$$T_{1eq} = \frac{S_{1eq} \cdot k_{ISC} + R_{eq}^{\bullet-} \cdot k_{oxRnT1}' \cdot <I>}{k_T' + k_{redT1}' + k_{diff} + (k_{oxT1}' + k_{oxTn} \cdot <I>)} \quad 5.1-33$$

Gleichung 5.1-28 umformen nach $T_{1eq} \rightarrow$

$$T_{1eq} = \frac{R_{eq}^{\bullet-} \cdot (k_{diff} + k_{oxS0}' + (k_{oxRnS0}' + k_{oxRnS1}' + k_{oxRnT1}') \cdot <I>) - S_{1eq} \cdot k_{redS1}'}{k_{redT1}'} \quad 5.1-34$$

Gleichung 5.1-33 + Gleichung 5.1-34 und umformen nach $R_{eq}^{\bullet-} \rightarrow$

$$R_{eq}^{\bullet-} = K_{R-} \cdot S_{1eq}$$

mit,

$$K_{R-} = \frac{\left(\frac{k_{ISC}}{x_{r1}} + \frac{k_{redS1}^*}{k_{redT1}^*} \right)}{\left(\frac{x_{r2}}{k_{redT1}^*} - \frac{k_{oxRnT1}^* \cdot \langle I \rangle}{x_{r1}} \right)}, \quad (\text{Gleichung 3.2-57})$$

$$x_{r1} = k_T' + k_{redT1}^* + k_{diff} + (k_{oxT1}' + k_{oxTn} \cdot \langle I \rangle),$$

$$x_{r2} = k_{diff} + k_{ox0}^* + (k_{oxRnS0}^* + k_{oxRnS1}^* + k_{oxRnT1}^*) \cdot \langle I \rangle$$

Gleichung 3.2-57 einsetzen in Gleichung 5.1-30 und umformen nach $S_{0eq} \rightarrow$

$$S_{0eq} = K_{S0} \cdot S_{1eq}$$

mit,

$$K_{S0} = \frac{x_s - K_{R-} \cdot (k_{oxRnS1}^* \cdot \langle I \rangle)}{k_{01}}, \quad (\text{Gleichung 3.2-58})$$

$$x_s = k_{koxS1}' + k_{koxSn} \cdot \langle I \rangle + k_{redS1}^* + k_{diff} + k_0'$$

Gleichung 3.2-57 einsetzen in Gleichung 5.1-33 und umformen nach $T_{1eq} \rightarrow$

$$T_{eq} = K_T \cdot S_{1eq}$$

$$\text{mit, } K_T = \frac{k_{ISC} + K_{R-} \cdot k_{oxRnT1}^* \cdot \langle I \rangle}{k_T' + k_{redT1}^* + k_{diff} + (k_{oxT1}' + k_{oxTn} \cdot \langle I \rangle)} \quad (\text{Gleichung 3.2-59})$$

Gleichung 3.2-59 einsetzen in Gleichung 5.1-27 und umformen nach $R_{eq}^{\bullet+} \rightarrow$

$$R_{eq}^{\bullet+} = K_{R+} \cdot S_{1eq}$$

$$\text{mit, } K_{R+} = \frac{(k_{koxS1}' + k_{koxSn} \cdot \langle I \rangle) + K_{T1} \cdot (k_{koxT1}' + k_{koxTn} \cdot \langle I \rangle)}{k_{redto1}' + k_{diff}} \quad (\text{Gleichung 3.2-60})$$

Gleichungen 3.2-57, 3.2-58, 3.2-59, 3.2-60 einsetzen in Gleichung 5.1-32 und umformen nach $S_{1eq} \rightarrow$

$$S_{\text{leq}} = \frac{1}{1 + K_{S0} + K_{T1} + K_{R+} + K_{R-}} \quad (\text{Gleichung 3.2-61})$$

5.2 Herleitung der leistungsdichteabhängigen Austauschrate

Bei einem 2D (x-y-Ebene) gaußförmigen Leistungsdichteprofil (Gleichung 2.4-2) und einer definierten Leistungsdichte-Schwelle I_S lässt sich ein Radius r_s definieren, innerhalb dessen die Leistungsdichte größer als I_S ist.

$$I_S(r) = I_0 \cdot \exp\left(-2 \cdot \frac{r_s^2}{\omega_0^2}\right) \quad 5.2-1$$

(2D-Gauß mit $r_s = \sqrt{x_s^2 + y_s^2}$)

r_s = Radius innerhalb des Anregungsvolumens innerhalb dessen die Leistungsdichte größer oder gleich ist wie I_S

I_0 = Leistungsdichte im Fokuspunkt

ω_0 = Radius des Anregungsvolumens in der x-y Ebene, innerhalb dessen die Leistungsdichte auf $1/e^2$ abgefallen ist ($\omega_0 = 0.77 \mu\text{m}$, Kapitel 2.4.1))

Bei einer konstanten Schwelle I_S ist der Radius r_s von der Leistungsdichte abhängig.

$$r_s(I_0) = \sqrt{\ln \frac{I_0}{I_S(x,y)} \cdot 0.5 \cdot \omega_0^2} \quad 5.2-2$$

Wird zusätzlich Diffusion eines Fluorophors in x-y-Ebene betrachtet mit einer mittleren quadratischen Verschiebung nach der Zeit t von $\langle r^2(t) \rangle$, so lässt sich bei $\langle r^2(t) \rangle = r_s^2(I_0)$ Gleichung 5.2-3 formulieren

$$\langle r^2(t) \rangle = \ln \frac{I_0}{I_S(x,y)} \cdot 0.5 \cdot \omega_0^2 \quad 5.2-3$$

mit

$$\langle r^2(t) \rangle = 4 \cdot D_F \cdot t \Rightarrow t = \frac{\langle r^2(t) \rangle}{4 \cdot D_F} \quad 5.2-4$$

und

$$k_{diff} = 1/t \quad 5.2-5$$

$$\Rightarrow k_{diff} = \frac{4 \cdot D_F}{0.5 \cdot \ln\left(\frac{I_0}{I_S(x,y)}\right) \cdot \omega_0^2} \quad 5.2-6$$

D_F = Diffusionskoeffizient des Fluorophors ($D_{Rh110} = 4.4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$)

Bei Messungen mit einer konfokalen Messanordnung mit einer Lochblende, muss zusätzlich das Detektionsvolumen, das durch die Transmission der Lochblende definiert wird, berücksichtigt werden. Unter den Bedingungen, dass die Sättigungseffekte, Photozerstörung, und Anregung des Fluorophors in langlebigen Radikalzustand außerhalb des Detektionsvolumens Vernachlässigbar sind (dies trifft nur bei Messungen unter niedrigen Leistungsdichten zu), entspricht die beobachtete Austauschrate, mit der die Fluorophore in bzw. aus dem Detektionsvolumen diffundieren, der maximalen möglichen Austauschrate k_{diff_max} . Gleichzeitig muss für kleinste mögliche Austauschrate gelten $k_{diff_min} > 0$, weil für die Bedingung $k_{diff} = 0$ ein unendlich großes Detektions- bzw. Anregungsvolumen, das eine unendlich große Leistungsdichte voraussetzt, notwendig wäre. Im Rahmen des durch die Gleichung 5.2-6 beschriebenen Modells wird für $I_S = I_0$ und $I_S > I_0$ $k_{diff}(I) \rightarrow \infty$ bzw. $k_{diff}(I) < 0$ erwartet. Beides ergibt für die Messungen unter den realen Messbedingungen keinen Sinn. Um das Modell den physikalischen Gegebenheiten anzupassen, wird eine zusätzliche Bedingung $0 < k_{diff}(I) \leq k_{diff_max}$ benötigt¹. Damit lautet die gesamte Gleichung für die Abhängigkeit der Austauschrate von der Leistungsdichte bei Messungen mit einer konfokalen Messanordnung:

¹ Die Anpassung der Gleichung 3.2-52 an Daten wurde beim den Fitalgorithmus mit Hilfe der Anpassung von Gleichung 5.2-6 mit einer zusätzlichen „wenn $0 > k_{diff}(I) > k_{diff_max}$, dann setze $k_{diff}(I) = k_{diff_max}$ “ Anweisung umgesetzt.

$$k_{diff}(I) = \begin{cases} \left(\frac{8 \cdot D_F}{\ln\left(\frac{I_0}{I_S}\right) \cdot \omega_0^2} \right); \{I_S < I_0\} \\ k_{diff_max}; \{I_S \geq I_0\} \end{cases} \quad (\text{Gleichung 3.2-52})$$

5.3 Anmerkung zur Singulettlöschung bei Küvettenexperimenten (Gleichung 3.2-79)

Bei sehr niedrigen Leistungsdichten die bei den Küvettenexperimenten (Kapitel 3.2.3.16) eingesetzt werden, kommt die Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands sehr nah an die Besetzungswahrscheinlichkeit eines 2-Zustände Modells (Abbildung 5.3-1)

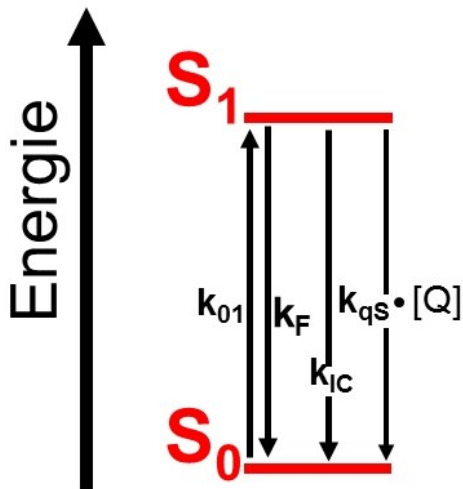


Abbildung 5.3-1 Ein 2-Niveau Energieschema für Anregung eines Fluorophors, mit den Geschwindigkeitskonstanten für die Anregung in den S_1 -Zustand k_{01} der Fluoreszenz k_F , der Internen Konversion k_{IC} und Singulettlöschung durch einen Additiv $k_{qS} \cdot [Q]$.

Die Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands für das 2-Niveau-Modell in der Abbildung 5.3-1 kann nach Gleichung 5.3-1 berechnet werden.

$$S_{1eq(2z)} = \frac{k_{01}}{k_{01} + (k_F + k_{IC} + k_{qS} \cdot [Q])} \quad 5.3-1$$

Bei sehr niedrigen Leistungsdichten ($k_{01} \ll k_F, k_{IC}, k_{qS} \cdot [Q]$) kann Gleichung 5.3-1 zur Gleichung 5.3-2 vereinfacht werden.

$$S_{1eq(2z)} \approx \frac{k_{01}}{k_F + k_{IC} + k_{qS} \cdot [Q]} \quad 5.3-2$$

Damit kann die Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit des S_I -Zustands durch einen Additiv bei sehr niedrigen Leistungsdichten durch Gleichung 5.3-3 beschrieben werden.

$$\frac{S_{1eq(2z)} \text{ (ohne Additiv)}}{S_{1eq(2z)} \text{ (mit Additiv)}} = \frac{k_F + k_{IC}}{k_F + k_{IC} + k_{qS} \cdot [Q]} \quad 5.3-3$$

Aus diesem Grund kann bei der Auswertung der Küvettenexperimenten die Singulettlöschung mit Hilfe der Gleichung 3.2-79 berücksichtigt werden.

$$k_{biot}' = \left[\frac{k_{ox}'}{k_{red}'} \cdot k_{bR1+}' + \frac{k_{ISC}}{k_T'} \cdot k_{bT1}' + k_{bS1}' \right] \cdot \frac{k_F + k_{IC}}{k_F + k_{IC} + k_{qS} \cdot [Q]} \quad (\text{Gleichung 3.2-79})$$

5.4 Übersicht der festgehaltenen Parameter für Anpassungen bei Messungen der Photozerstörung

Tabelle 5.4-1 Festgehaltene Parameter für die Anpassung der Gleichung 3.2-79 an k_b -Daten im Kapitel 3.2.9

<i>Rh 123-spezifisch</i>					
k_{ISC}^a [$10^5 \cdot s^{-1}$]	k_{T0}^a [$10^5 \cdot s^{-1}$]	k_{red0}^a [s^{-1}]	$k_F^b + k_{IC}$ [$10^8 \cdot s^{-1}$]	k_{ox0}^a [s^{-1}]	k_{01}^b [$cm^2 \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}$]
7.6	4.2	1500	2.5	16000	645
<i>additivspezifisch</i>					
$k_{qR^+}(AZB-C)^a$ [$10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]	$k_{qox}(AZB-C)^a$ [$10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]	$k_{qT(AZB-C)}^a$, ($k_{qT(A-AZB-C)}^a$) [$10^9 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$]			
0.02	15.0	3.6 (3.9)			

Für die Messungen unter sauerstofffreien Bedingungen wurde $k_{ISC} = 2.5 \cdot 10^5 s^{-1}$ und $k_T = 4 \cdot 10^3 s^{-1}$ verwendet [64].

^a [24]

^b siehe Kapitel 3.2.3.2

5.5 Detaillierte Ergebnisse der Anpassungen der FCS-Kurven

Als Ergebnisse der Anpassungen sind folgende Parameter zusammengetragen:

$\langle I \rangle$ mittlere Leistungsdichte in kW/cm²

t_d Relaxationszeit des Diffusionsterms in ms

z_0/ω_0 Formfaktor des Detektionsvolumens

A_T Amplitude des Tripletterms

t_T Relaxationszeit des Tripletterms in μs

$A_{R^+}(\text{norm})$ Amplitude des Radikalkationterms

t_{R^+} Relaxationszeit des Radikalkationterms in ms

$F_{cpm}(FCS)$ Fluoreszenzzählrate pro Molekül in kHz

N mittlere Anzahl der Fluorophore im konfokalen Volumen entspricht der inversen Amplitude des Diffusionsterms der Gleichung 3.2-11

$$N = \frac{N_{S,R}}{1 - A_T}$$

N_F mittlere Anzahl der Fluorophore im konfokalen Volumen, die sich in S_0 oder S_I Zustand befinden (Anzahl der fluoreszierenden Fluorophore), entspricht der inversen Gesamtamplitude der Gleichung 3.2-11

$$N_F = \frac{N_{S,R}}{1 + A_{R^+}}$$

Bei den *FCS*-Kurven, die in der Gegenwart von *Trolox-AZB-C* Mischung aufgenommen wurden, konnte der Tripletterm nicht vom Radikalanionterm getrennt werden. Deswegen ist in Tabelle 5.5-11, Tabelle 5.5-12 und Tabelle 5.5-13 anstatt der Triplettamplitude und der Tripletrelaxationszeit die Amplitude A_{T,R^-} und die Relaxationszeiten t_I (in μs) zu finden (Kapitel 3.2.6.3).

Bei individuellen Anpassungen in der Gegenwart von Trolox oder *A-AZB-C* (Tabelle 5.5-14-Tabelle 5.5-20) sind anstatt der Amplituden bzw. der Relaxationszeiten der Triplet- und Radikal- Terme, die Amplituden A_I und A_2 zusammen mit den Relaxationszeiten t_I und t_2 (beide in μs) angegeben (Kapitel 3.2.6).

Tabelle 5.5-1 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive, Messung 1

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
11	0.98	0.86	0.14	3.89	0.11	2.69	0.02	0.47	98	1.33
15	0.99	0.81	0.14	3.70	0.15	2.31	0.05	0.43	119	1.10
18	0.99	0.77	0.14	3.57	0.17	2.38	0.07	0.40	136	1.49
26	0.99	0.70	0.15	3.51	0.21	2.13	0.10	0.35	163	1.21
33	0.98	0.64	0.15	3.53	0.24	2.10	0.13	0.32	180	1.16
41	0.95	0.57	0.15	2.82	0.29	1.92	0.16	0.29	198	1.25
48	0.95	0.54	0.15	2.79	0.30	1.95	0.18	0.27	199	1.00
55	0.93	0.50	0.16	2.33	0.32	1.82	0.20	0.26	206	1.11
69	0.91	0.44	0.16	1.92	0.36	1.72	0.23	0.23	209	0.95
94	0.88	0.38	0.18	1.55	0.40	1.60	0.28	0.20	208	1.67
130	0.84	0.32	0.18	1.30	0.44	1.46	0.32	0.17	198	1.25
184	0.80	0.26	0.18	1.16	0.48	1.33	0.38	0.15	177	2.13
295	0.80	0.21	0.16	1.02	0.52	1.14	0.45	0.12	142	1.45
440	0.72	0.16	0.11	1.80	0.54	1.04	0.52	0.09	115	1.74
584	0.65	0.12	0.09	2.94	0.56	1.00	0.57	0.08	97	2.48
736	0.55	0.09	0.08	4.90	0.58	0.93	0.61	0.07	86	2.09
927	0.47	0.07	0.09	4.73	0.60	0.98	0.65	0.06	79	2.51

Tabelle 5.5-2 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive, Messung 2

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
11	2.52	2.22	0.14	3.83	0.10	2.64	0.02	0.47	96	1.66
16	2.56	2.05	0.15	4.24	0.15	2.43	0.05	0.42	124	1.27
22	2.58	1.91	0.15	3.86	0.19	2.25	0.09	0.37	148	1.40
30	2.61	1.76	0.15	3.64	0.23	2.15	0.12	0.33	171	1.08
40	2.61	1.59	0.15	3.35	0.27	1.95	0.16	0.29	190	1.25
59	2.60	1.38	0.16	2.57	0.33	1.77	0.21	0.25	205	1.02
80	2.55	1.19	0.17	2.06	0.37	1.63	0.25	0.22	206	1.35
109	2.48	1.02	0.19	1.44	0.41	1.55	0.30	0.19	200	1.34
146	2.43	0.89	0.19	1.21	0.44	1.41	0.34	0.16	187	1.34
224	2.41	0.73	0.19	1.01	0.49	1.24	0.41	0.13	157	1.94
368	2.56	0.62	0.16	1.05	0.53	1.09	0.49	0.10	116	1.64
539	2.84	0.57	0.11	1.89	0.55	1.01	0.55	0.08	83	1.92
654	2.95	0.53	0.09	3.00	0.56	0.97	0.59	0.07	71	1.96
926	3.58	0.52	0.10	5.34	0.59	0.96	0.65	0.06	48	3.00

Tabelle 5.5-3 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive, Messung 3

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
11	2.84	2.42	0.14	4.40	0.13	2.46	0.02	0.46	95	1.16
15	2.93	2.34	0.14	4.05	0.16	2.45	0.05	0.42	115	1.09
19	2.97	2.24	0.14	3.55	0.19	2.33	0.07	0.39	130	0.95
27	3.05	2.08	0.15	3.48	0.24	2.23	0.11	0.35	152	0.89
34	3.05	1.90	0.15	3.55	0.28	2.05	0.14	0.31	165	0.69
49	3.10	1.69	0.16	2.92	0.33	1.88	0.19	0.27	178	0.85
65	3.16	1.54	0.16	2.14	0.37	1.72	0.22	0.24	177	0.94
77	3.20	1.46	0.17	1.97	0.39	1.68	0.25	0.22	177	0.78
114	3.20	1.24	0.16	1.66	0.44	1.45	0.31	0.18	167	1.27
151	3.28	1.14	0.17	1.36	0.47	1.35	0.35	0.16	153	1.23
231	3.47	1.02	0.17	1.05	0.50	1.20	0.41	0.13	126	1.50
306	3.64	0.95	0.13	1.35	0.52	1.12	0.46	0.11	107	2.06
455	3.99	0.86	0.09	2.65	0.55	1.02	0.52	0.09	80	1.59
607	4.52	0.83	0.08	6.56	0.57	0.96	0.57	0.08	61	2.11
724	4.85	0.80	0.08	7.45	0.58	0.95	0.61	0.07	51	2.95

Tabelle 5.5-4 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) ohne Additive. Messung 4 (Messung in großer Probenkammer (*Thermo Scientific, Nunc Lab-Tek II, 155360* Kapitel 3.2.5)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R+} (norm)	t_{R+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
11	1.99	1.71	0.14	3.84	0.13	2.52	0.02	0.47	94	1.00
13	2.03	1.69	0.14	4.62	0.14	2.54	0.03	0.44	108	0.84
15	2.05	1.65	0.14	4.20	0.16	2.38	0.04	0.43	115	1.12
19	2.12	1.60	0.14	4.51	0.19	2.21	0.07	0.40	131	1.12
22	2.17	1.57	0.15	4.06	0.21	2.21	0.09	0.37	142	0.80
26	2.22	1.52	0.15	4.40	0.23	2.15	0.11	0.35	155	0.92
30	2.26	1.49	0.15	3.99	0.25	2.08	0.12	0.33	162	1.06
37	2.37	1.45	0.15	3.96	0.28	2.04	0.15	0.30	171	0.84
44	2.46	1.40	0.15	2.96	0.31	1.91	0.17	0.28	177	1.06
52	2.52	1.35	0.15	2.81	0.33	1.82	0.19	0.26	181	0.86
59	2.56	1.31	0.15	2.81	0.35	1.75	0.21	0.25	182	0.82
66	2.63	1.28	0.15	2.53	0.37	1.70	0.23	0.24	184	1.11
73	2.70	1.25	0.16	2.09	0.39	1.65	0.24	0.23	182	1.12
88	2.76	1.20	0.15	2.28	0.41	1.55	0.27	0.21	179	0.80
110	2.90	1.15	0.16	1.72	0.43	1.47	0.30	0.19	172	1.05
146	3.14	1.11	0.15	1.62	0.46	1.34	0.34	0.16	156	1.54
183	3.37	1.10	0.15	1.49	0.48	1.25	0.38	0.15	142	1.60
201	3.38	1.06	0.17	1.08	0.49	1.23	0.39	0.14	135	1.79
220	3.49	1.05	0.14	1.32	0.50	1.19	0.40	0.13	127	2.11
238	3.59	1.05	0.14	1.21	0.50	1.17	0.42	0.13	123	2.15
256	3.63	1.02	0.16	1.02	0.51	1.15	0.43	0.12	117	2.36
274	3.79	1.04	0.13	1.36	0.51	1.13	0.44	0.12	110	1.99
293	3.86	1.03	0.12	1.58	0.51	1.11	0.45	0.12	105	1.65
329	4.06	1.03	0.12	1.53	0.52	1.08	0.47	0.11	98	2.27
348	4.28	1.06	0.10	1.81	0.52	1.06	0.48	0.11	91	2.64
366	4.44	1.07	0.10	2.03	0.53	1.05	0.49	0.10	87	2.06
403	4.66	1.08	0.10	2.16	0.53	1.02	0.50	0.10	80	2.21
439	4.95	1.10	0.09	2.89	0.54	0.99	0.52	0.09	73	1.80
512	5.68	1.16	0.08	4.54	0.55	0.96	0.54	0.08	62	1.82
549	5.88	1.16	0.08	5.69	0.55	0.96	0.56	0.08	58	1.74
586	6.36	1.22	0.07	7.43	0.56	0.94	0.57	0.08	53	1.84
622	6.29	1.17	0.07	8.37	0.56	0.95	0.58	0.07	50	2.55
659	6.85	1.23	0.07	8.83	0.56	0.93	0.59	0.07	45	2.33

Tabelle 5.5-5 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *AZB-C* (250 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
11	1.95	1.77	0.13	4.65	0.05	0.90	0.04	0.33	105	1.57
15	1.98	1.74	0.14	4.91	0.06	1.40	0.07	0.31	127	1.51
18	2.01	1.68	0.14	4.87	0.08	0.83	0.09	0.29	153	1.39
25	2.07	1.62	0.14	4.68	0.10	0.84	0.13	0.25	187	1.01
33	2.14	1.59	0.15	4.06	0.11	0.85	0.17	0.23	213	1.09
45	2.18	1.47	0.15	4.28	0.14	0.86	0.22	0.20	247	1.18
58	2.23	1.38	0.15	3.98	0.16	0.82	0.26	0.17	265	1.16
74	2.26	1.28	0.15	3.95	0.19	0.76	0.31	0.15	275	1.36
112	2.35	1.14	0.15	2.94	0.22	0.71	0.38	0.12	272	2.03
146	2.38	1.03	0.14	3.31	0.24	0.67	0.43	0.10	260	1.89
223	2.48	0.90	0.13	5.47	0.27	0.63	0.50	0.08	225	1.67
299	2.62	0.83	0.12	6.19	0.29	0.58	0.55	0.06	191	2.07
437	2.84	0.76	0.11	158.47	0.32	0.57	0.61	0.05	149	1.51
581	3.21	0.75	0.11	129.30	0.33	0.59	0.65	0.04	116	3.42
736	3.33	0.70	0.11	74.12	0.34	0.61	0.68	0.03	93	4.07
939	3.64	0.68	0.13	7.39	0.36	0.60	0.71	0.03	73	4.57

Tabelle 5.5-6 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *AZB-C* (500 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
11	1.99	1.84	0.14	4.80	0.03	0.46	0.05	0.25	100	1.54
15	2.04	1.82	0.14	5.52	0.03	1.17	0.07	0.23	130	1.03
18	2.09	1.79	0.14	4.75	0.06	0.59	0.09	0.22	148	1.37
22	2.11	1.77	0.14	5.29	0.05	0.57	0.11	0.21	172	1.93
29	2.16	1.72	0.15	5.33	0.07	0.60	0.15	0.19	207	1.30
43	2.26	1.63	0.15	5.02	0.09	0.54	0.21	0.16	255	1.04
58	2.33	1.53	0.16	5.57	0.11	0.52	0.26	0.14	285	1.37
77	2.38	1.44	0.16	5.37	0.13	0.53	0.31	0.12	305	1.23
112	2.47	1.30	0.16	4.52	0.15	0.50	0.38	0.09	313	1.60
146	2.52	1.20	0.15	6.79	0.17	0.46	0.43	0.08	306	1.42
223	2.63	1.05	0.15	10.40	0.20	0.44	0.50	0.06	275	2.10
296	2.66	0.96	0.14	103.96	0.21	0.43	0.55	0.05	244	1.74
440	2.76	0.84	0.13	201.47	0.23	0.42	0.60	0.04	195	3.17
582	3.23	0.89	0.13	248.86	0.25	0.41	0.64	0.03	158	4.03
727	3.11	0.79	0.13	123.21	0.25	0.40	0.66	0.02	133	5.45
894	3.25	0.78	0.14	4.80	0.25	0.41	0.68	0.02	112	5.35

Tabelle 5.5-7 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *AZB-C* (800 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
11	1.70	1.56	0.14	4.37	0.03	0.44	0.05	0.20	102	1.24
16	1.74	1.53	0.15	4.50	0.04	0.36	0.08	0.18	141	1.32
22	1.77	1.51	0.15	4.47	0.04	0.59	0.11	0.17	178	1.00
29	1.80	1.46	0.15	4.32	0.06	0.42	0.14	0.15	215	1.42
39	1.88	1.42	0.16	4.01	0.07	0.47	0.19	0.13	257	1.39
57	1.91	1.31	0.17	4.44	0.09	0.37	0.25	0.11	300	1.31
82	1.96	1.21	0.17	4.02	0.11	0.35	0.31	0.09	326	1.38
109	1.99	1.12	0.18	3.66	0.12	0.37	0.36	0.08	337	1.61
148	2.00	1.01	0.18	3.58	0.14	0.32	0.41	0.06	335	1.61
227	2.07	0.90	0.57	-0.46	0.16	0.32	0.49	0.05	304	2.92
368	2.07	0.75	0.16	14.27	0.18	0.29	0.55	0.03	255	2.86
541	1.94	0.63	0.15	22.54	0.20	0.27	0.60	0.02	210	3.71
660	1.99	0.60	0.13	206.81	0.21	0.35	0.62	0.02	173	8.16
926	2.01	0.55	0.13	122.25	0.22	0.25	0.65	0.02	145	8.25

Tabelle 5.5-8 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *A-AZB-C* (50 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
10	2.78	2.54	0.15	3.89	0.08	1.54	0.01	0.03	91	1.33
16	2.82	2.47	0.16	3.39	0.11	1.84	0.02	0.03	135	1.40
25	2.84	2.31	0.17	3.08	0.16	1.70	0.03	0.03	187	1.10
41	2.84	2.13	0.17	3.68	0.21	1.50	0.05	0.03	242	1.57
65	2.86	1.93	0.18	2.70	0.28	1.41	0.07	0.03	301	0.69
96	2.76	1.69	0.18	3.17	0.33	1.28	0.09	0.03	341	1.03
160	2.67	1.45	0.18	4.01	0.39	1.18	0.11	0.03	373	1.89
238	2.53	1.24	0.18	5.36	0.44	1.08	0.13	0.03	379	4.15
479	2.52	1.05	0.16	335.61	0.51	1.04	0.16	0.03	330	37.55
642	3.52	1.35	0.16	222.12	0.54	1.06	0.17	0.03	222	46.18

Tabelle 5.5-9 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *A-AZB-C* (300 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
10	2.50	2.44	0.15	4.24	0.02	1.79	0.00	0.006	87	1.37
16	2.54	2.35	0.15	4.13	0.07	0.61	0.01	0.006	134	1.15
25	2.58	2.36	0.15	3.89	0.08	0.77	0.01	0.006	185	1.13
41	2.61	2.30	0.16	3.78	0.11	0.88	0.01	0.006	270	0.69
65	2.70	2.23	0.16	3.21	0.16	0.71	0.02	0.006	352	0.93
96	2.74	2.15	0.16	3.53	0.20	0.67	0.02	0.006	422	0.87
160	2.79	2.04	0.17	3.11	0.24	0.63	0.03	0.006	497	1.09
238	2.83	1.96	0.17	3.33	0.28	0.60	0.04	0.006	534	1.30
479	2.92	1.85	0.18	3.02	0.33	0.55	0.05	0.006	538	2.01
642	2.99	1.82	0.18	2.56	0.35	0.55	0.06	0.006	506	3.07

Tabelle 5.5-10 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *A-AZB-C* (600 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_T	t_T	A_{R+} (norm)	t_{R+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
10	2.52	2.45	0.15	3.98	0.03	1.22	0.001	0.003	78	1.18
16	2.12	1.99	0.17	117	0.06	26.3	0.003	0.003	122	1.73
25	2.41	2.24	0.15	4.19	0.07	0.51	0.004	0.003	179	1.45
41	2.63	2.39	0.16	4.15	0.08	0.42	0.007	0.003	258	1.01
65	2.69	2.37	0.16	3.87	0.11	0.36	0.010	0.003	348	0.97
96	2.77	2.34	0.16	4.32	0.14	0.35	0.014	0.003	437	1.35
160	2.82	2.26	0.17	3.71	0.18	0.34	0.019	0.003	521	1.68
238	2.87	2.22	0.17	3.08	0.21	0.33	0.024	0.003	557	1.43
479	3.19	2.31	0.17	2.83	0.25	0.32	0.034	0.003	548	1.95
642	4.93	3.42	0.18	2.44	0.28	0.29	0.041	0.003	428	2.10

Tabelle 5.5-11 Ergebnisse des *Radikalkation-Targetfits* für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *Trolox/AZB-C-Mischung* (500 μ M/100 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	$A_{T,R}$	t_1	A_{R+} (norm)	t_{R+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
8	4.18	1.83	0.13	4.44	0.07	0.10	0.01	0.005	38	1.40
11	2.24	1.91	0.14	3.86	0.03	0.18	0.01	0.005	98	0.98
15	1.99	1.89	0.14	4.64	0.04	0.74	0.02	0.005	141	1.15
18	1.86	1.78	0.14	4.03	0.04	1.13	0.02	0.005	170	1.40
22	1.95	1.83	0.14	4.57	0.07	1.01	0.03	0.005	206	1.38
30	1.94	1.77	0.14	4.16	0.08	0.78	0.04	0.005	254	1.12
44	1.94	1.73	0.14	3.72	0.11	0.86	0.05	0.005	336	1.19
59	1.96	1.68	0.15	3.19	0.12	0.69	0.06	0.005	393	0.88
75	1.92	1.61	0.15	3.41	0.14	0.74	0.07	0.005	454	0.98
110	1.87	1.50	0.16	3.33	0.17	0.73	0.09	0.005	541	0.80
146	1.83	1.41	0.17	2.84	0.19	0.66	0.11	0.005	585	0.99
218	1.81	1.33	0.17	2.72	0.21	0.62	0.13	0.004	638	1.08
293	1.64	1.17	0.18	2.66	0.24	0.58	0.15	0.004	669	1.23
439	1.50	1.03	0.19	2.21	0.27	0.59	0.16	0.004	687	1.15
588	1.32	0.88	0.20	1.91	0.28	0.63	0.18	0.004	686	1.40
731	1.19	0.79	0.20	1.84	0.31	0.67	0.19	0.004	679	1.69
906	1.12	0.73	0.21	1.75	0.34	0.70	0.19	0.004	651	2.78

Tabelle 5.5-12 Ergebnisse des Radikalkation-Targetfits für Rh 110 in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von Trolox/AZB-C-Mischung (800 μ M/100 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_{T,R^-}	t_1	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
8	1.55	2.63	0.13	4.67	0.03	0.10	0.01	0.005	133	1.47
11	2.63	2.61	0.14	3.61	0.03	3.04	0.01	0.005	109	1.32
17	2.59	2.48	0.14	3.87	0.06	0.63	0.02	0.005	156	1.15
22	2.77	2.49	0.14	3.76	0.04	0.18	0.03	0.005	182	1.40
29	2.58	2.40	0.14	4.11	0.06	0.39	0.04	0.005	245	0.99
40	2.53	2.29	0.15	3.30	0.08	0.47	0.05	0.005	304	1.12
58	2.40	2.13	0.15	3.01	0.10	0.39	0.06	0.005	395	0.99
82	2.38	2.00	0.16	3.02	0.11	0.38	0.08	0.005	459	1.46
109	2.22	1.84	0.16	2.91	0.14	0.42	0.10	0.005	538	1.31
148	2.10	1.67	0.17	2.47	0.15	0.42	0.11	0.004	592	1.59
228	1.92	1.45	0.18	2.07	0.18	0.39	0.14	0.004	661	1.87
369	1.68	1.21	0.38	0.62	0.21	0.40	0.17	0.004	681	1.78
542	1.46	1.02	0.37	0.66	0.23	0.44	0.19	0.004	685	1.11
662	1.32	0.92	0.35	0.70	0.25	0.51	0.20	0.004	690	1.39
928	1.14	0.78	0.35	0.70	0.28	0.66	0.21	0.004	652	1.14

Tabelle 5.5-13 Ergebnisse des Radikalkation-Targetfits für Rh 110 in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von Trolox/AZB-C-Mischung (800 μ M/200 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_{T,R^-}	t_1	A_{R^+} (norm)	t_{R^+}	F_{cpm} (FCS)	χ^2
7	2.38	2.28	0.14	3.93	0.03	1.54	0.01	0.003	72	1.45
11	2.25	2.18	0.14	3.86	0.06	2.07	0.01	0.003	111	1.15
16	2.20	2.12	0.14	4.07	0.07	3.80	0.02	0.003	159	1.20
22	2.24	2.14	0.14	4.07	0.05	1.88	0.03	0.002	198	0.95
30	2.13	2.01	0.14	4.04	0.09	1.95	0.03	0.002	260	1.17
41	2.13	1.96	0.14	4.01	0.09	1.49	0.04	0.002	324	1.26
60	2.08	1.86	0.15	3.58	0.11	1.47	0.06	0.002	415	0.96
80	2.01	1.75	0.15	3.21	0.14	1.37	0.07	0.002	491	1.05
110	1.89	1.61	0.16	3.24	0.17	1.43	0.09	0.002	579	1.15
148	1.82	1.50	0.16	3.12	0.18	1.18	0.10	0.002	637	1.50
221	1.66	1.32	0.16	2.98	0.20	1.01	0.13	0.002	714	1.55
364	1.46	1.11	0.17	2.54	0.23	0.87	0.15	0.002	764	1.53
552	1.26	0.94	0.18	2.27	0.24	0.79	0.17	0.002	774	1.56
723	1.10	0.81	0.19	2.10	0.26	0.78	0.18	0.002	767	1.38
966	0.99	0.70	0.20	1.69	0.27	0.71	0.19	0.002	729	1.31

Tabelle 5.5-14 Ergebnisse der individuellen Anpassungen von FCS-Kurven für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *Trolox* (50 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_1	t_1	A_2	t_2	F_{cpm} (FCS)	χ^2
1	1.84	1.84	0.13	4.26	0	----	0	----	17	0.71
2	1.83	1.75	0.13	4.29	0.04	2.44	0	----	24	0.62
4	1.84	1.70	0.13	4.34	0.07	1.64	0	----	39	0.55
6	1.86	1.71	0.14	4.75	0.08	2.86	0	----	61	0.74
7	1.88	1.70	0.14	3.91	0.10	3.26	0	----	73	0.46
11	1.91	1.67	0.14	4.26	0.12	3.35	0	----	102	0.45
15	1.92	1.61	0.14	4.61	0.16	2.90	0	----	128	0.57
19	1.93	1.57	0.14	4.22	0.19	2.76	0	----	151	0.61
25	1.96	1.50	0.15	4.18	0.24	2.62	0	----	183	0.68
33	2.00	1.43	0.16	3.60	0.07	5.85	0.21	1.96	207	0.58
47	2.06	1.36	0.16	3.92	0.26	1.79	0.09	5.35	246	0.43
62	2.02	1.23	0.16	4.08	0.29	1.61	0.10	5.05	272	0.31
76	2.00	1.16	0.16	3.92	0.33	1.59	0.09	5.24	289	0.51
110	1.98	1.04	0.17	3.59	0.37	1.40	0.10	4.85	313	0.53
147	1.92	0.94	0.18	3.53	0.42	1.29	0.09	5.17	331	0.38
219	1.83	0.83	0.19	3.02	0.47	1.17	0.07	5.98	346	0.50
295	1.62	0.69	0.20	2.60	0.50	1.06	0.07	6.15	348	0.61
444	1.44	0.55	0.22	2.08	0.54	0.92	0.08	6.04	339	0.71
585	1.33	0.48	0.21	2.31	0.56	0.89	0.08	5.89	328	0.69
725	1.30	0.44	0.21	2.26	0.59	0.85	0.07	6.28	306	0.70
891	1.19	0.38	0.25	1.50	0.60	0.81	0.08	6.49	284	0.64

Tabelle 5.5-15 Ergebnisse der individuellen Anpassungen von FCS-Kurven für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *Trolox* (100 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_1	t_1	A_2	t_2	F_{cpm} (FCS)	χ^2
1	1.55	1.55	0.13	4.98	0	----	0	----	18	0.76
2	1.57	1.49	0.13	4.20	0.05	7.43	0	----	25	0.62
4	1.56	1.45	0.13	4.18	0.07	2.47	0	----	39	0.66
6	1.58	1.47	0.14	4.14	0.07	4.47	0	----	63	0.55
8	1.58	1.43	0.14	4.02	0.10	3.65	0	----	76	0.48
11	1.62	1.39	0.14	3.98	0.14	3.47	0	----	104	0.58
15	1.64	1.35	0.14	4.07	0.18	3.32	0	----	131	0.60
22	1.67	1.28	0.14	4.67	0.23	3.17	0	----	172	0.49
29	1.69	1.20	0.15	3.49	0.22	3.65	0.07	1.20	199	0.38
43	1.78	1.16	0.16	3.62	0.21	1.86	0.14	4.59	237	0.47
60	1.74	1.03	0.16	3.51	0.17	1.30	0.24	3.58	267	0.53
74	1.74	0.96	0.17	3.61	0.29	3.08	0.16	1.00	284	0.42
110	1.72	0.87	0.17	3.49	0.26	1.16	0.23	3.10	311	0.40
146	1.67	0.79	0.18	3.13	0.20	3.18	0.33	1.11	328	0.41
219	1.55	0.68	0.19	2.86	0.14	3.29	0.42	1.08	348	0.43
301	1.42	0.59	0.19	2.64	0.13	3.04	0.46	1.01	360	0.58
439	1.25	0.49	0.20	2.41	0.46	0.85	0.15	2.48	361	0.62
589	1.12	0.42	0.20	2.18	0.16	2.19	0.47	0.77	356	0.68
727	1.09	0.39	0.21	1.98	0.13	2.23	0.51	0.75	341	0.75
890	0.97	0.34	0.22	1.79	0.55	0.74	0.10	2.39	335	0.83

Tabelle 5.5-16 Ergebnisse der individuellen Anpassungen von FCS-Kurven für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *Trolox* (200 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_1	t_1	A_2	t_2	F_{cpm} (FCS)	χ^2
1	1.86	1.86	0.13	4.46	0	----	0	----	17	0.57
2	1.94	1.94	0.13	4.81	0	----	0	----	24	0.63
4	1.95	1.84	0.13	4.38	0.06	3.84	0	----	39	0.60
6	1.99	1.80	0.14	3.82	0.10	4.96	0	----	61	0.65
7	1.97	1.78	0.13	4.08	0.09	3.25	0	----	70	0.53
11	2.00	1.70	0.14	3.77	0.15	4.00	0	----	103	0.48
15	2.01	1.63	0.14	4.04	0.19	3.40	0	----	125	0.56
22	2.07	1.54	0.15	3.84	0.14	2.33	0.11	5.23	164	0.62
29	2.09	1.45	0.15	3.94	0.03	0.53	0.28	3.53	193	0.47
44	2.14	1.32	0.15	4.23	0.06	0.56	0.32	3.21	232	0.65
58	2.19	1.25	0.16	3.99	0.10	0.94	0.32	3.21	254	0.51
73	2.17	1.17	0.17	3.80	0.19	1.25	0.28	3.38	271	0.42
110	2.15	1.04	0.17	3.94	0.35	2.67	0.16	0.93	299	0.46
148	2.09	0.94	0.18	3.60	0.28	2.80	0.26	1.01	315	0.56
217	1.97	0.83	0.18	3.49	0.28	0.87	0.29	2.40	337	0.48
291	1.81	0.74	0.19	3.47	0.24	2.32	0.35	0.88	352	0.53
439	1.58	0.61	0.20	2.67	0.38	0.75	0.24	2.03	362	0.43
586	1.41	0.53	0.19	2.98	0.50	0.84	0.13	2.43	359	0.54
728	1.38	0.49	0.20	2.41	0.44	0.68	0.20	1.81	350	0.60
887	1.25	0.43	0.20	2.44	0.54	0.74	0.11	2.31	342	0.43

Tabelle 5.5-17 Ergebnisse der individuellen Anpassungen von FCS-Kurven für Tabelle 5.5-18 *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *A-AZB-C* (50 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_1	t_1	A_2	t_2	F_{cpm} (FCS)	χ^2
2	2.77	2.77	0.21	3.01	0	----	0	----	25	0.70
6	2.78	2.66	0.14	4.86	0.04	2.27	0	----	62	0.67
10	2.75	2.54	0.14	4.23	0.07	1.98	0	----	92	0.44
16	2.76	2.45	0.15	4.18	0.11	1.90	0	----	138	0.59
25	2.75	2.30	0.15	3.99	0.16	1.83	0	----	193	0.43
41	2.72	2.13	0.15	3.2	0.22	1.62	0	----	253	0.47
65	2.70	1.92	0.15	4.27	0.28	1.41	0.05	36.77	319	0.30
96	2.56	1.69	0.15	6.34	0.32	1.2	0.04	25.10	368	0.47
160	2.54	1.44	0.19	3.21	0.39	1.10	0.08	23.80	392	0.48
238	2.36	1.23	0.19	3.37	0.43	0.99	0.09	21.45	405	0.48
479	2.27	1.02	0.22	2.31	0.48	0.83	0.13	16.30	367	0.54
642	3.06	1.29	0.23	1.95	0.51	0.77	0.14	14.24	255	0.43

Tabelle 5.5-19 Ergebnisse der individuellen Anpassungen von FCS-Kurven für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *A-AZB-C* (300 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_1	t_1	A_2	t_2	F_{cpm} (FCS)	χ^2
2	2.49	2.82	0.15	3.73	0	----	0	----	23	0.58
6	2.50	2.76	0.15	3.97	0.02	6.88	0	----	59	0.69
10	2.50	2.74	0.14	4.40	0.03	1.61	0	----	88	0.50
16	2.53	2.68	0.14	4.37	0.07	0.72	0	----	134	0.47
24	2.57	2.69	0.15	4.10	0.08	0.83	0	----	185	0.46
41	2.60	2.67	0.15	4.01	0.12	1.01	0	----	271	0.28
65	2.69	2.65	0.16	3.54	0.17	0.77	0	----	360	0.57
97	2.56	2.62	0.16	3.91	0.07	0.24	0.11	1.15	451	0.69
160	2.71	2.65	0.17	3.69	0.08	0.15	0.20	0.93	512	1.43
244	2.77	2.87	0.17	4.15	0.26	0.50	0.06	3.18	546	1.85
479	2.82	3.60	0.18	4.24	0.30	0.43	0.07	2.99	558	3.25
638	2.84	4.32	0.18	3.68	0.31	0.38	0.10	2.38	533	4.36

Tabelle 5.5-20 Ergebnisse der individuellen Anpassungen von FCS-Kurven für *Rh 110* in Phosphatpuffer (25 mM pH 7) in Gegenwart von *A-AZB-C* (600 μ M)

$\langle I \rangle$	N	N_F	t_d	z_0/ω_0	A_1	t_1	A_2	t_2	F_{cpm} (FCS)	χ^2
2	2.78	2.72	0.15	5.37	0.02	5.78	0	----	20	0.74
6	2.69	2.62	0.15	3.71	0.03	2.56	0	----	50	0.65
10	2.52	2.45	0.15	4.02	0.03	1.18	0	----	78	0.51
16	2.04	1.84	0.16	82.75	0.10	0.30	0	----	128	1.46
24	2.39	2.11	0.15	4.72	0.12	0.13	0	----	180	0.67
41	2.62	2.39	0.15	4.23	0.09	0.46	0	----	258	0.38
65	2.69	2.36	0.16	4.03	0.12	0.38	0	----	349	0.46
99	2.74	2.25	0.16	4.62	0.10	0.09	0.09	0.73	441	0.72
162	2.76	2.16	0.16	4.12	0.11	0.08	0.12	0.62	531	1.03
236	2.81	2.14	0.17	3.46	0.13	0.11	0.13	0.68	570	1.23
484	3.10	2.24	0.17	3.46	0.19	0.16	0.10	0.97	565	1.89
645	3.45	2.37	0.18	2.86	0.24	0.15	0.10	1.20	520	2.26

5.6 Die Abnahme der Konzentration der Fluorophore in den verwendeten Probenkammern

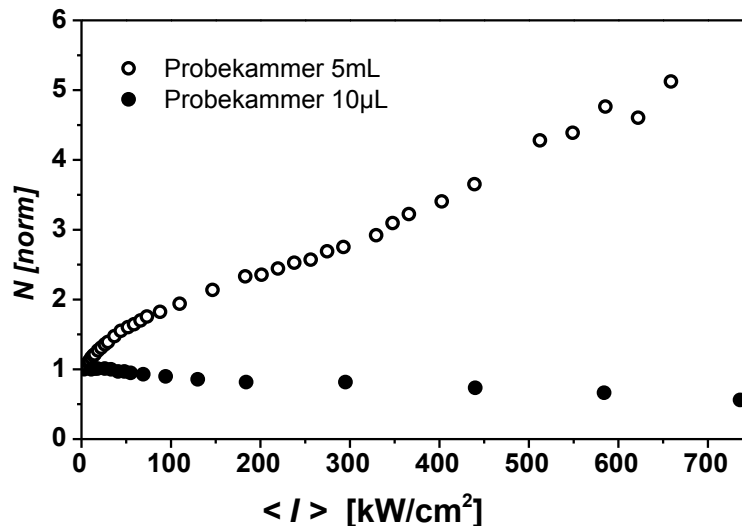


Abbildung 5.6-1 Aus den *FCS*-Messungen, mittels Gleichung 3.2-50 ermittelte Anzahl der Fluorophore N im konfokalen Volumen. Die gefüllte Symbole repräsentieren die Messungen in Probenkammern mit einem Gesamtvolumen von $V = 10 \mu\text{L}$ (gefüllte Symbole) (Kapitel 3.2.3.8). Die leere Symbole repräsentieren die Messungen in Probenkammern mit einem Gesamtvolumen von $V = 5 \text{ mL}$ (*Thermo Scientific, Nunc Lab-Tek II, 155360*).

Bei Leistungsdichtemessreihen wurden die Messungen bei den jeweiligen Leistungsdichten hintereinander durchgeführt, wobei eine Messreihe immer mit der kleinsten Leistung begonnen wurde. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Messungen einer Messreihe betrug 2-5 Minuten (die Zeit, die benötigt wurde für die Umstellung und die Bestimmung der Laserleistung).

Aufgrund der Sättigungseffekten (Kapitel 2.4.2) wird bei einer Messreihe mit der Leistungsdichte kontinuierlich ansteigende Anzahl der Fluorophore N im Detektionsvolumen beobachtet, obwohl die Konzentration der Fluorophore konstant bleibt. Wird eine Probenkammer mit einem kleinen Gesamtvolumen eingesetzt so nimmt die Konzentration der Fluorophore während der Messreihe mit der Zeit ab, was dazu führt, dass die Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen trotz Sättigungseffekten während einer Messreihe mit steigenden Leistungsdichte abnimmt (Abbildung 5.6-1).

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *FCS*-Messungen von *Rh 110* mit Additiven wurden in Probenkammern mit einem Gesamtvolumen von $V = 10 \mu\text{L}$

durchgeführt, was zur Folge hatte, dass die Anzahl der Fluorophore nicht als konstant während eine Messreihe angenommen werden konnte.

5.7 Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(FCS)$ bei FCS-Messungen des Rh 110 mit und ohne Additive

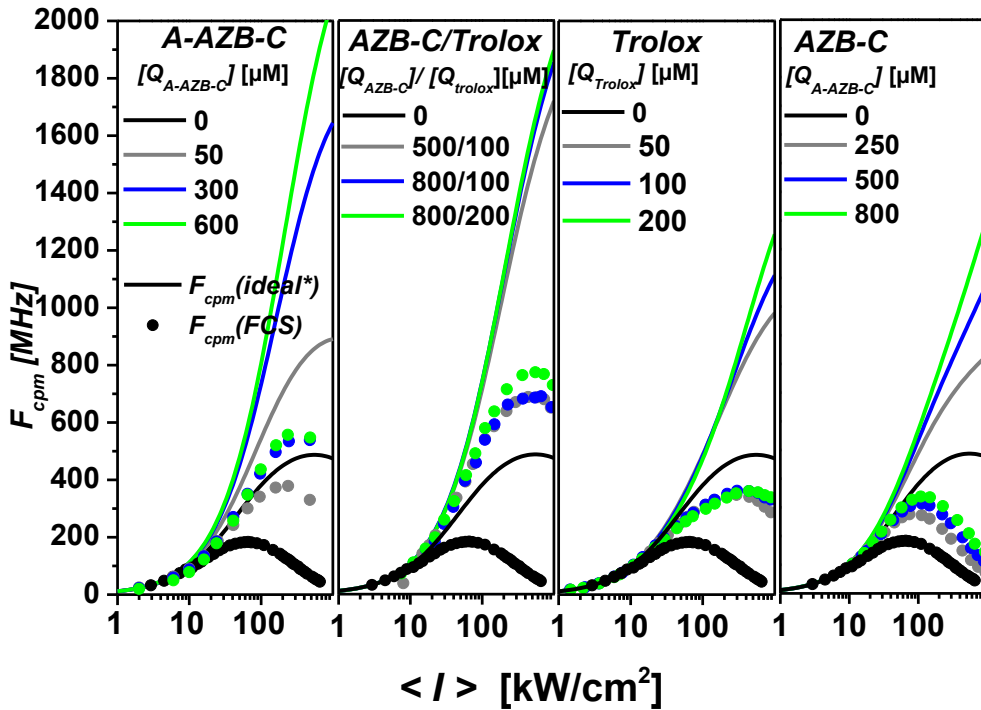


Abbildung 5.7-1 Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$ zusammen mit direkt aus FCS-Messungen bestimmten $F_{cpm}(FCS)$ (Kapitel 3.2.3.14) von Rh 110 mit und ohne Additive. $F_{cpm}(ideal^*)$ wurde mit Hilfe von Gleichung 3.2-44 (mit $G_{detect} = 0.02$) und der in Tabelle 3.2-14 (Seite 136) angegebenen Konstanten berechnet. Die für Gleichung 3.2-44 notwendige Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands wurde nach Gleichung 3.2-61 (Seite 121) bestimmt, wobei für die Austauschrate $k_{diff} = 8000 \text{ s}^{-1}$ eingesetzt wurde. Zu beachten ist, dass bei der berechneten Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal^*)$ im Vergleich zu der im Kapitel 3.2.8.2 verwendeten Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(ideal)$ die Austauschrate nicht auf $k_{diff} = 0$ gesetzt wird. Der Unterschied zwischen $F_{cpm}(ideal^*)$ und $F_{cpm}(ideal)$ ist in Abbildung 5.7-2 visuell dargestellt.

Neben der im Kapitel 3.2.8.2 verwendeten Fluoreszenzzählrate eines Fluorophors $F_{cpm}(ideal)$, kann zusätzlich die Fluoreszenzzählrate direkt aus den FCS-Messungen bestimmt werden (Kapitel 3.2.3.14). Diese direkt gemessene Fluoreszenzzählrate eines Fluorophors $F_{cpm}(FCS)$ repräsentiert eine sowohl von der Austauschrate k_{diff} , als auch von den Sättigungseffekten abhängige Fluoreszenzzählrate, die nicht für die quantitative Betrachtung eines Fluoreszenzsignals herangezogen werden kann. Bei der Verwendung der Additive zeigt die direkt bestimmte Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}(FCS)$ (Abbildung 5.7-1 gefüllte Symbole) qualitativ die gleichen Ergebnisse,

wie sie anhand von der $F_{cpm}(ideal)$ (Abbildung 5.7-1 durchgezogene Linien) im Kapitel 3.2.8.2 diskutiert wurden.

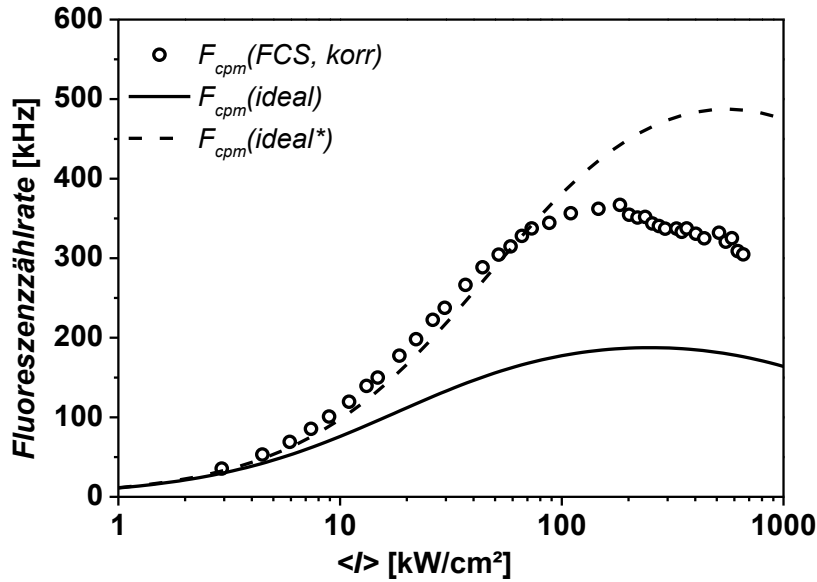


Abbildung 5.7-2 Berechnetes Fluoreszenzsignal eines einzelnen *Rh 110* Moleküls $F_{cpm}(ideal)$ (durchgezogene Linie) und $F_{cpm}(ideal^*)$ zusammen mit unter *FCS* Bedingungen gemessenen korrigierten Fluoreszenzzählrate des *Rh 110* $F_{cpm}(FCS,korr)$ (leere Punkte) (Kapitel 3.2.5.3) in Abhängigkeit von der Leistungsdichte. $F_{cpm}(ideal)$ und $F_{cpm}(ideal^*)$ wurden mit Hilfe von Gleichung 3.2-44 (mit $G_{detect} = 0.02$) und der in *Tabelle 3.2-14* angegebenen Konstanten berechnet. Die für Gleichung 3.2-44 notwendige Besetzungswahrscheinlichkeit des S_1 -Zustands wurde nach Gleichung 3.2-17 (*Modell 1a*) bestimmt. Für die Austauschrate wurde bei $F_{cpm}(ideal^*)$ $k_{diff} = 8000$ und bei $F_{cpm}(ideal)$ $k_{diff} = 0$ eingesetzt. Alle Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung wurden auf 0 fixiert.

5.8 Erweiterung des elektronischen Zustandmodells für gepulste Anregung

Der im Kapitel 3.2.5.1 präsentierte Ausdruck für das Fluoreszenzsignal (Gleichung 3.2-44) beinhaltet Besetzungswahrscheinlichkeiten für die energetischen Zustände des Fluorophors, die im Kapitel 3.2.4 für Fluorophore bei kontinuierlicher Anregung diskutiert wurden. Weil die Einzelmolekülmessungen bei gepulster Anregung (Argon-Ionen-Laser mit einer Pulsbreite von $t_{on} \approx 180$ ps bei einer Repetitionsrate von $k_{rep} = 73.5$ MHz bei 496 nm) durchgeführt wurden, werden in diesem Kapitel die Besetzungswahrscheinlichkeiten bei gepulster Anregung analog zu Kapitel 3.2.4 diskutiert.

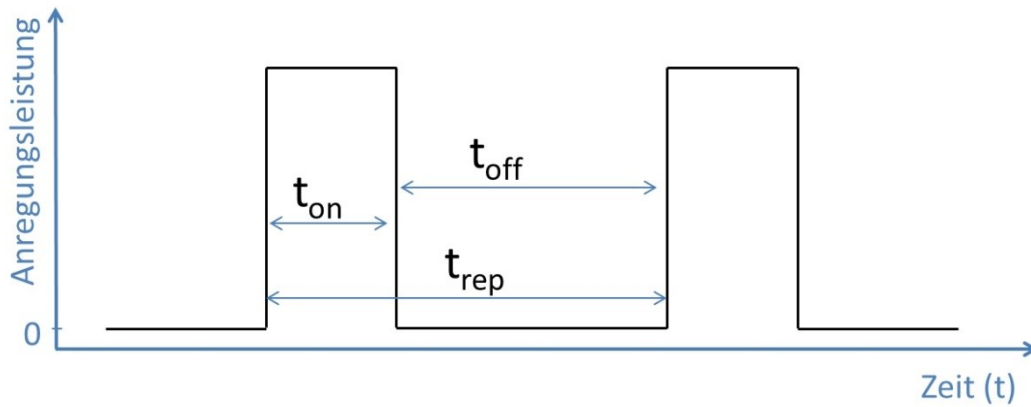


Abbildung 5.8-1 Vereinfachtes Modell für gepulste Anregung mit t_{rep} als Repetitionszeit, t_{on} als Pulsdauer und t_{off} als Zeit zwischen den Pulsen.

Für die Besetzungswahrscheinlichkeiten bei gepulster Anregung muss berücksichtigt werden, dass jegliche Anregung nur während der Pulsdauer t_{on} (Abbildung 5.8-1) erfolgen kann. Damit befindet sich das gesamte System während der Repetitionszeit nicht im Gleichgewicht, es müssen also anstatt der Gleichgewichtspopulationen die Durchschnittspopulationen genutzt werden. Die Durchschnittspopulationen für S_I und T_I während der Repetitionszeit sind durch Gleichungen 5.8-1 und 5.8-2 definiert [93],

$$\langle S_I \rangle = \frac{\kappa}{1 + \kappa k_{ISC} / k_T'} \quad 5.8-1$$

$$\langle T_I \rangle = \frac{k_{ISC}}{k_T'} \frac{\kappa}{1 + \kappa k_{ISC} / k_T'} \quad 5.8-2$$

wobei

$$\kappa = \frac{k_{01} \cdot t_{on}}{(k_0' + k_{01}) \cdot t_{rep}} - \frac{k_{01}^2}{(k_0' + k_{01})^2 \cdot k_0' \cdot t_{rep}} \cdot \frac{[1 - \exp(-k_0' \cdot t_{off})][1 - \exp(-(k_0' + k_{01}) \cdot t_{on})]}{1 - \exp(-k_{01} \cdot t_{on} - k_0' \cdot t_{rep})} \quad 5.8-3$$

Weil die Lebensdauer des T_1 -Zustands sehr lang ist (mehrere Größenordnungen länger als die in der Arbeit verwendete Laser Repetitionszeit ($t_{rep} = 13.6 \text{ ns} \ll \tau_{trip}$)), ändert sich während der Repetitionszeit die Population des T_I -Zustands praktisch nicht, die Durchschnittspopulation des T_n -Zustands $\langle T_n \rangle$ kann analog zur

Gleichgewichtspopulation bei kontinuierlichen Anregung berechnet werden (Gleichung 5.8-4).

$$\langle T_n \rangle = \frac{k_{T1n}}{k_{Tn1}} \langle T_1 \rangle \quad 5.8-4$$

Gleichzeitig ist die Lebensdauer des S_I -Zustands ($t_{rep} = 13.6 \text{ ns} > \tau_F = 4 \text{ ns}$) kürzer als die Repetitionszeit, dadurch unterscheidet sich die Population des S_I -Zustands während der Pulsdauer ($\approx 180 \text{ ps}$) deutlich von der Population zwischen den Pulsen. Für die Berechnung der Durchschnittspopulation des S_n -Zustands $\langle S_n \rangle$ wird nur die Durchschnittspopulation des S_I -Zustands während der Pulsdauer $\langle S_I \rangle_{t_{on}}$ berücksichtigt (Gleichung 5.8-5). Dabei werden die Gleichungen 1.1-16 und 1.1-17 analog zu den Gleichungen 5.8-1 - 5.8-3 hergeleitet [93]:

$$\langle S_n \rangle = \frac{k_{1n}}{k_{Sn1}} \langle S_I \rangle_{t_{on}} \quad 5.8-5$$

$$\langle S_I \rangle_{t_{on}} = \frac{\kappa_{on}}{1 + \kappa_{on} k_{ISC} / k_T'} \quad 5.8-6$$

$$\kappa_{on} = \frac{k_{01}}{(k_0' + k_{01})} - \frac{k_{01}}{(k_0' + k_{01})^2 \cdot k_0' \cdot t_{on}} \cdot \frac{[1 - \exp(-k_0' \cdot t_{off})] \cdot [1 - \exp(-(k_0' + k_{01}) \cdot t_{on})]}{1 - \exp(-k_{01} \cdot t_{on} - k_0' \cdot t_{rep})} \quad 5.8-7$$

Für die Geschwindigkeitskonstante der Oxidation eines Fluorophors zum Radikalkation bei der gepulsten Anregung ($k_{ox tot}'(puls)$) gilt schließlich analog zu Gleichung 3.2-23 Gleichung 5.8-8:

$$k_{ox tot}'(puls) = k_{oxS} \cdot \langle S_I \rangle + k_{oxT} \cdot \langle T_1 \rangle + k_{oxSn} \cdot \langle S_n \rangle + k_{oxTn} \cdot \langle T_n \rangle + k_{qox} \cdot [Q] \cdot \langle S_I \rangle \quad 5.8-8$$

5.9 Diffusionskontrollierte Stoßrate

Die Stoßraten k_{qdiff} zwischen zwei Reaktionspartnern F und Q lassen sich mit Hilfe der Gleichung 5.9-1 berechnen.

$$k_{qdiff} = 4 \cdot \pi \cdot R_G \cdot D_G \cdot N_A \quad 5.9-1$$

Mit

$$R_G = R_F + R_Q$$

$$D_G = D_F + D_Q$$

$R_{F,Q}$ = Kollisionsradien der Reaktionspartner F, Q

$D_{F,Q}$ = Diffusionskoeffiziente der Reaktionspartner F, Q

N_A = Avogadro Konstante

Wird angenommen, dass die Kollisionsradien den hydrodynamischen Radien entsprechen, so lassen sich die Kollisionsradien mittels der Einstein-Smoluchowski-Beziehung (Gleichung 5.9-2) bestimmen.

$$D_{F,Q} = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_{F,Q}} \quad 5.9-2$$

k_B = Boltzmann-Konstante

η = Viskosität des Lösungsmittels

T = Temperatur

Die Kombination von Einstein-Gleichung (Gleichung 5.9-2) und Gleichung 5.9-1 führt zu Gleichungen 5.9-3 oder 5.9-4 mit denen sich die Stoßrate leicht abschätzen lässt¹.

$$k_{qdiff} = \frac{k_B \cdot T \cdot N_A \cdot R_G}{1.5 \cdot \eta} \left(\frac{1}{R_Q} + \frac{1}{R_F} \right) \quad 5.9-3$$

$$k_{qdiff} = \frac{k_B \cdot T \cdot N_A \cdot D_G}{1.5 \cdot \eta} \left(\frac{1}{D_Q} + \frac{1}{D_F} \right) \quad 5.9-4$$

¹ Beim Zusammenstoß zweier Reaktionspartner kann zusätzlich deren Ausrichtung zueinander für die Reaktion entscheidend sein. Deswegen stellen die Gleichungen 5.9-3 und 5.9-4 eine Näherung für die maximal mögliche diffusionskontrollierte Reaktionsgeschwindigkeit dar, tatsächlich werden eher kleinere Reaktionsgeschwindigkeiten erwartet.

Für *Rh 110* (oder *Rh 123*) mit den Diffusionskoeffizient von $D_{Rh110} = 4.4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ($D_{Rh123} = 4.3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) [46] und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Additive (Kapitel 3.2), die ähnliche hydrodynamische Radien haben wie die Rhodamine (Kapitel 5.12), beträgt die diffusionskontrollierte Stoßrate ungefähr $k_{qdiff} \approx 6.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Bei der Reaktion mit molekularem Sauerstoff ($D_{O_2} = 2.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) beträgt die diffusionskontrollierte Stoßrate ungefähr $k_{qdiff} \approx 7.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Zu beachten ist, dass bei einer Additivkonzentration von $[Q] \leq 1 \text{ mM}$ Löschung des S_I -Zustands des *Rh 110* bzw. *Rh 123* durch einen Additiv vernachlässigt werden kann, auch wenn sie diffusionskontrolliert abläuft. Der Grund dafür ist die relativ große Geschwindigkeitskonstante für die Relaxation des S_I -Zustands bei *Rh 110* bzw. *Rh 123* von $k_0 = 2.5 \cdot 10^8 \cdot \text{s}^{-1}$.

5.10 Abkürzungen

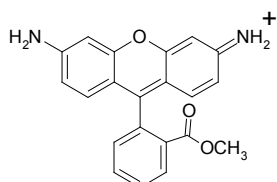
<i>APD</i>	<i>avalanche photo diode</i>
<i>A-AZB-C</i>	<i>4-[(4-Aminophenyl)diazenyl]benzoesäure</i>
<i>AZB-C</i>	<i>4-(Phenylazo)-benzoesäure</i>
<i>BIFL</i>	<i>Burst integrated fluorescence lifetime</i>
<i>Burst</i>	<i>Einzelmolekülfluoreszenzereignis</i>
<i>CFD</i>	<i>computational fluid dynamics</i>
<i>CW</i>	<i>Continuous waves</i>
<i>FCS</i>	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
<i>FEM</i>	<i>Finite-Elemente-Methode</i>
<i>MFD</i>	<i>Multiparameterfluoreszenzdetektion</i>
<i>OPV</i>	<i>Oligophenylenvenylen</i>
<i>PDMS</i>	<i>Polydimethylsiloxan</i>
<i>Rh xxx</i>	<i>Rhodamin xxx</i>
<i>SMD</i>	<i>single molecule detection</i>
<i>TAC</i>	<i>Time to amplitude converter</i>
<i>TCSPC</i>	<i>time correlated single photon counting</i>
<i>THF</i>	<i>Tetrahydrofuran</i>
$[Q]$, c_X	Konzentration, (in dieser Arbeit wird bei Dunkelzuständen löschenden Additiven die Abkürzung „ $[Q]$ “ (von engl. <i>Quencher</i>), bei allen anderen Substanzen wird die Abkürzung „ c_X “ (von engl. <i>concentration</i>) für die Konzentration einer beliebigen Substanz „ X “ verwendet)

5.11 Chemikalienliste

Hexamol® 1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisononylester		BASF
Tetrahydrofuran	(p.a.)	Sigma-Aldrich
Chloroform	(p.a.)	Acros Organics
PDMS RTV615		General Electric
Aktivkohle	(p.a.) gekörnt	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	(p.a.)	Grüssing
Natriumdihydrogenphosphat	(p.a.)	AppliChem
PVC $M_n \sim 99000$ g/mol		Aldrich 346764
PVC high mol. weight		Aldrich 81387
PVC low mol. weight		Aldrich 81388
PVC $M_n \sim 47000$ g/mol		Aldrich 389323
Trolox 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure		Fluka
Rhodamin 123		Sigma
Rhodamin 110		Radiant Dyes Chemie
Schwefelsäure 95-97%		Fluka
Wasserstoffperoxid	zur Analyse	Grüssing
Trimethylchlorosilan	98%	Acros Organics
Glycerin	(p.a., wasserfrei)	Carl Roth
4-(phenylazo)-benzoesäure (AZB-C)	98 %	Aldrich
Triacetin	99%	Aldrich
Die nachfolgenden Verbindungen wurden an der Heine-Universität Düsseldorf am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie in Arbeitskreisen von PD Dr. K.Schapera, Prof. Dr. J.J. Müllera und Prof. Dr. Dr. h. c. Helmut Ritter synthetisiert		
^a 4-[(4-Aminophenyl)diazenyl]benzoesäure (A-AZB-C, Struktur siehe Kapitel 5.12)		

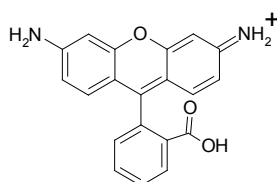
^b OPV 5 (Struktur siehe Kapitel 5.12)	
--	--

5.12 Chemische Struktur einiger ausgewählter Verbindungen



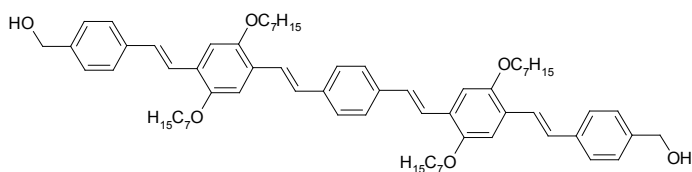
Absorptionsmaximum (in H_2O):
 $\epsilon(500 \text{ nm}) = 7.0 \cdot 10 M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Rhodamin 123

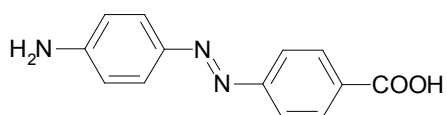


Absorptionsmaximum (in H_2O):
 $\epsilon(496 \text{ nm}) = 6.8 \cdot 10 M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

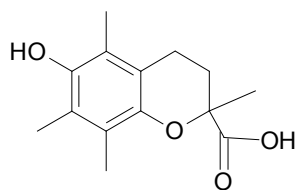
Rhodamin 110



OPV 5



A-AZB-C



Trolox

Abbildung 5.12-1 Chemische Strukturen eingesetzter Verbindungen

Literatur

1. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1999, New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
2. Widengren, J., Ü. Mets, and R. Rigler, *Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**: p. 13368-13379.
3. Elson, E.L. and D. Magde, Fluorescence correlation spectroscopy 1. Basis and theory. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 1-27.
4. Kohler, R.H., et al., *Active protein transport through plastid tubules: velocity quantified by fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of Cell Science, 2000. **113**(22): p. 3921-3930.
5. Widengren, J. and P. Schwille, *Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A, 2000. **104**(27): p. 6416-6428.
6. Elson, E.L. and D. Magde, *Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory*. Biopolymers, 1974. **13**: p. 1-27.
7. Fries, J.R., et al., *Quantitative identification of different single-molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A, 1998. **102**: p. 6601-6613.
8. Kühnemuth, R. and C.A.M. Seidel, *Principles of Single Molecule Multiparameter Fluorescence Spectroscopy*. Single Molecules, 2001. **2**(4): p. 251-254.
9. Eggeling, C., et al., *Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection*. Journal of Biotechnology, 2001. **86**(3): p. 163-180.
10. Rothwell, P.J., et al., *Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase: primer/template complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(4): p. 1655-1660.
11. Widengren, J., et al., *Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(6): p. 2039-2050.
12. Becker, K., et al., *How chromophore shape determines the spectroscopy of phenylene-vinylenes: Origin of spectral broadening in the absence of aggregation*. Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(16): p. 4859-4864.
13. Löwe, C. and C. Weder, *Oligo(p-phenylene vinylene) excimers as molecular probes: Deformation-induced color changes in photoluminescent polymer blends*. Advanced Materials, 2002. **14**(22): p. 1625-1629.
14. Tretiak, S., et al., *Conformational dynamics of photoexcited conjugated molecules*. Physical Review Letters, 2002. **89**(9): p. 097402.
15. Ikawa, T., T. Shiga, and A. Okada, *Measurement of residual stresses in injection-molded polymer parts by time-resolved fluorescence*. Journal of Applied Polymer Science, 2002. **83**(12): p. 2600-2603.
16. Röhrig, U.F., U. Troppmann, and I. Frank, *Organic chromophores under tensile stress*. Chemical Physics, 2003. **289**(2-3): p. 381-388.

17. Hofstraat, J.W., et al., *Charge-transfer fluorescent probes applied to the characterization of thermal and mechanical properties of polymers*. Journal of Fluorescence, 1998. **8**(4): p. 335-342.
18. Sartori, S.S., et al., *Host matrix dependence on the photophysical properties of individual conjugated polymer chains*. Macromolecules, 2003. **36**(2): p. 500-507.
19. Edel, J.B. and A.J. de Mello, *Single particle confocal fluorescence spectroscopy in microchannels: Dependence of burst width and burst area distributions on particle size and flow rate*. Analytical Sciences, 2003. **19**(7): p. 1065-1069.
20. Pfeil, S.H., et al., *A microfluidic mixing system for single-molecule measurements*. Review of Scientific Instruments, 2009. **80**(5).
21. Gosch, M., et al., *Hydrodynamic flow profiling in microchannel structures by single molecule fluorescence correlation spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(14): p. 3260-3265.
22. Rehm, D. and A. Weller, *Kinetics of fluorescence quenching by electron and H-atom transfer*. Israel Journal of Chemistry, 1970. **8**: p. 259-271.
23. Rehm, D. and A. Weller, *Bindungszustand und Fluoreszenzspektren von Hetero-Excimeren*. Zeitschrift für Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics, 1970. **69**: p. 183-200.
24. Pfiffi, D., *Steigerung der Signalstärke und der Photostabilität von Fluorophoren in der Einzelmolekülspektroskopie in PC II*. 2010, HHU: Düsseldorf.
25. Seidel, C.A.M., *Laserspektroskopische Untersuchungen molekularer Aspekte der nukleobasenspezifischen Löschung von Fluoreszenzfarbstoffen*. 1992, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
26. Magde, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy*. Physical Review Letters, 1972. **29**: p. 705-708.
27. Eggeling, C. 1999, Georg-August-Universität Göttingen, Germany.
28. Eggeling, C., *Photostabilitätsuntersuchungen an Fluoreszenzfarbstoffen für einen Einzelmolekülnachweis*. 1996, Georg-August-Universität Göttingen.
29. Schwille, P., et al., *Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation*. Biophysical Journal, 1999. **77**(4): p. 2251-2265.
30. Widengren, J., et al., *Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A, 2007. **111**(3): p. 429-440.
31. Widengren, J., *Fluorescence Correlation Spectroscopy, Photophysical Aspects And Applications*. 1996, Karolinska Institutet Stockholm.
32. Korobov, V.E. and A.K. Chibisov, *Primary processes in the photochemistry of rhodamine dyes*. Journal of Photochemistry, 1978. **9**(4): p. 411-424.
33. Stevens, B., R.R. Sharpe, and W.S.W. Bingham, *pH-dependence of rhodamine B semiquinone dismutation rate in aqueous alcoholic solution*. Photochemistry and Photobiology, 1967. **6**: p. 83-89.

34. Dempster, D.N., T. Morrow, and M.F. Quinn, *The photochemical characteristics of rhodamine 6G-ethanol solutions*. Journal of Photochemistry, 1973. **2**: p. 343-359.
35. Dunne, A. and M.F. Quinn, *Triplet-Triplet Absorption Spectra and the Spectra of the Photoreduced States of Rhodamine B and Rhodamine 110*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, 1959. **I**(6): p. 1104-1110.
36. Gurdzhiyan, L.M., et al., *Mechanism of formation of photoproducts of rhodamine dyes*. Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii, 1979. **31**(4): p. 665-668.
37. Song, L., et al., *Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy*. Biophysical Journal, 1995. **68**: p. 2588-2600.
38. Song, L.L., et al., *Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy*. Biophysical Journal, 1996. **70**(6): p. 2959-2968.
39. Eggeling, C., et al., *Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(13): p. 2651-2659.
40. Marawske, S., et al., *Fluorophores as optical sensors for local forces*. ChemPhysChem, 2009: p. 2041-2048
41. Goodwin, P.M., W.P. Ambrose, and R.A. Keller, *Single-molecule detection in liquids by laser-induced fluorescence (Review)*. Accounts of Chemical Research, 1996. **29**(12): p. 607-613.
42. Fries, J.R., *Charakterisierung einzelner Moleküle in Lösung mit Rhodamin-Farbstoffen*. 1998, Universität-Gesamthochschule Siegen.
43. Keller, R.A., et al., *Single-molecule fluorescence analysis in solution*. Applied Spectroscopy, 1996. **50**(7): p. 12A-32A.
44. Enderlein, J., et al., *The statistics of single molecule detection: an overview*. Bioimaging, 1997. **5**: p. 88-98.
45. Ko, D.S., et al., *Determination of the diffusion coefficient of dye in solution at single molecule level*. Chemical Physics Letters, 1997. **269**: p. 54-58.
46. Gendron, P.O., F. Avaltroni, and K.J. Wilkinson, *Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient-Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Journal of Fluorescence, 2008. **18**(6): p. 1093-1101.
47. Enderlein, J., *Fluorescence correlation spectroscopy (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 2013. **85**(5): p. 999-1016.
48. B. R. Crenshaw, C.W., *Phase Separation of Excimer-Forming Fluorescent Dyes and Amorphous Polymers: A Versatile Mechanism for Sensor Applications*. Advanced Materials, 2005. **17**(12): p. 1471-1476.
49. Egelhaaf, H.-J., J. Gierschner, and D. Oelkrug, *Characterization of oriented oligo(phenylenevinylene) films and nano-aggregates by UV/Vis-absorption and fluorescence spectroscopy*. Synthetic Metals, 1996. **83**(3): p. 221-226.
50. Gierschner, J., et al., *Solid-state optical properties of linear polyconjugated molecules: pi-stack contra herringbone*. Journal of Chemical Physics, 2005. **123**(14).
51. Elias, H.-G., ed. *Makromoleküle* Vol. 1. 1990, Hüthig & Wepf Verlag Basel.
52. Grandbois, M., et al., *How Strong Is a Covalent Bond?* Science, 1999. **283**(5408): p. 1727-1730.

53. Odell, J.A. and A. Keller, *Flow-induced chain fracture of isolated linear macromolecules in solution*. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 1986. **24**(9): p. 1889-1916.
54. Koleske, J.V. and R.D. Lundberg Journal of Polymer Science Part a-2-Polymer Physics, 1969. **7**(5PA2): p. 795-&.
55. Gill, D.S., et al. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, 1993. **89**(21): p. 3955-3958.
56. Rodriguez, M., et al. Journal of Chemical and Engineering Data, 1994. **39**(1): p. 102-105.
57. Damerau, T. and M. Hennecke Journal of Chemical Physics, 1995. **103**(14): p. 6232-6240.
58. Springer, H., et al. Colloid and Polymer Science, 1983. **261**(10): p. 800-804.
59. Spano, F.C., *Absorption and emission in oligo-phenylene vinylene nanoaggregates: The role of disorder and structural defects*. Chemical Physics, 2002. **116**(13): p. 5877-5891.
60. Penzkofer, A. and J. Wiedmann Optics Communications, 1980. **35**(1): p. 81-86.
61. Mühle, M., *Steigerung der Signalstärke durch photoprotektive Additive in der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie*. 2011.
62. Beaumont, P.C., D.G. Johnson, and B.J. Parsons, *Excited state and free radical properties of rhodamine dyes in aqueous solution. A laser flash photolysis and pulse radiolysis study*. Journal of Photochemistry & Photobiology A-Chemistry, 1997. **107**: p. 175-183.
63. Chmyrov, A., T. Sanden, and J. Widengren, *Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter-Mechanisms and Possible Implications*. Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(34): p. 11282-11291.
64. Pfiffi, D., et al., *Diphenylhexatrienes as photoprotective agents for ultrasensitive fluorescence detection*. Journal of Physical Chemistry A, 2010. **114**: p. 4099-4108.
65. Eggeling, C., et al., *Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions used for Single-Molecule-Detection: Evidence of Two-Step Photolysis*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(13): p. 2651-2659.
66. Marcus, R.A., *On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I*. Journal of Chemical Physics, 1956. **24**(5): p. 966-978.
67. Marcus, R.A., *On the Theory of Electron-Transfer Reactions. VI. Unified Treatment for Homogeneous and Electrode Reactions*. Journal of Chemical Physics, 1965. **43**(2): p. 679-701.
68. Marcus, R.A., *On the Theory of Chemiluminescent Electron-Transfer Reactions*. Journal of Chemical Physics, 1965. **43**(8): p. 2654-2657.
69. Kavarnos, G.J. and N.J. Turro, *Photosensitization by Reversible Electron Transfer: Theories, Experimental Evidence, and Examples*. Chemical Reviews, 1986. **86**: p. 401-449.
70. Widengren, J., R. Rigler, and Ü. Mets, *Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Journal of Fluorescence, 1994. **4**(3): p. 255-258.
71. Rasnik, I., S.A. McKinney, and T. Ha, *Nonblinking and longlasting single-molecule fluorescence imaging*. Nature Methods, 2006. **3**(11): p. 891-893.

72. Vogelsang, J., et al., *A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. **47**(29): p. 5465-5469.
73. Ferguson, M.W., et al., *Excited state and free radical properties of Rhodamine 123: a laser flash photolysis and radiolysis study*. Physical Chemistry Chemical Physics, 1999. **1**(2): p. 261-268.
74. Dean, J.A., *Lange's Handbook of Chemistry*. 1992, McGraw-Hill.
75. Astrand, P.O., et al., *Ab initio calculation of the electronic spectrum of azobenzene dyes and its impact on the design of optical data storage materials*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(14): p. 3482-3487.
76. Cordes, T., J. Vogelsang, and P. Tinnefeld, *On the Mechanism of Trolox as Antiblinking and Antibleaching Reagent*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(14): p. 5018-+.
77. Kubin, R.F. and A.N. Fletcher Journal of Luminescence, 1982. **27**(4): p. 455-462.
78. Kalinin, S., et al., *Note: A 4 ns hardware photon correlator based on a general-purpose field-programmable gate array development board implemented in a compact setup for fluorescence correlation spectroscopy*. Review of Scientific Instruments, 2012. **83**(9).
79. Koppel, D.E., *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy*. Physical Review A, 1974. **10**(6): p. 1938-1945.
80. Eggeling, C., et al., *Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1998. **95**: p. 1556-1561.
81. Lemke, E.A., et al., *Microfluidic Device for Single-Molecule Experiments with Enhanced Photostability*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(38): p. 13610-+.
82. Gosting, L.J. and D.F. Akeley Journal of the American Chemical Society, 1952. **74**(8): p. 2058-2060.
83. Brody, J.P., et al., *Biotechnology at low Reynolds numbers*. Biophysical Journal, 1996. **71**(6): p. 3430-3441.
84. Tellinghuisen, J., et al., *Analysis of Fluorescence Lifetime Data for Single Rhodamine Molecules in Flowing Sample Streams*. Analytical Chemistry, 1994. **66**: p. 64-72.
85. H., S.J., *Strömungslehre*. 2010, Berlin: Springer.
86. Knight, J.B., et al., *Hydrodynamic focusing on a silicon chip: Mixing nanoliters in microseconds*. Physical Review Letters, 1998. **80**(17): p. 3863-3866.
87. Lee, C.H., K. Jiang, and G.J. Davies, *Sidewall roughness characterization and comparison between silicon and SU-8 microcomponents*. Materials Characterization, 2007. **58**(7): p. 603-609.
88. Magde, D., W.W. Webb, and E.L. Elson. Biopolymers, 1978. **17**(2): p. 361-376.
89. Rigler, R., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. European Biophysics Journal, 1993. **22**: p. 169-175.

90. Dittrich, P.S. and P. Schwille, *Spatial two-photon fluorescence cross-correlation Spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(17): p. 4472-4479.
91. Brister, P.C., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy for flow rate imaging and monitoring - optimization, limitations and artifacts*. Lab on a Chip, 2005. **5**(7): p. 785-791.
92. Arbour, T.J. and J. Enderlein, *Application of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy to microfluidic flow-velocity measurement*. Lab on a Chip, 2010. **10**(10): p. 1286-1292.
93. Gregor, I., D. Patra, and J. Enderlein, *Optical saturation in fluorescence correlation spectroscopy under continuous-wave and pulsed excitation*. ChemPhysChem, 2005. **6**(1): p. 164-170.

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.

Für die Möglichkeit, die dieser Arbeit zugrunde liegende Forschung durchzuführen, den mir zugebilligten Freiraum und besonders für das mir entgegengebrachte Geduld und Vertrauen, möchte ich Herrn Prof. Dr. Claus A. M. Seidel danken

Ein besonderer Dank gilt Ralf Kühnemuth für seine Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellungen, für seine Hilfe bei der Lösung unzähliger technischer Probleme im Labor, und nicht zuletzt für das eine oder andere Abendessen. Ohne seine Hilfe wäre diese Arbeit in der Form sicher nicht realisierbar gewesen

Ich möchte mich besonders herzlich bei Stefan Marawske bedanken, für eine sehr produktive Zusammenarbeit im Bereich der Molekularen Kraftsensoren.

Ich bedanke mich bei Stanislav Kalinin und Suren Felekyan für ihre geduldigen Auskünfte und Unterstützung bei theoretischen Fragestellungen und Auswerteproblemen.

Für die Hilfe mit dem Mikromixer möchte ich mich bei Shawn Pfeil und Everett A. Lipman bedanken.

Mein Dank gilt allen derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Claus A. M. Seidel für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Ich möchte mich zusätzlich herzlich bedanken für die besonders große Hilfsbereitschaft beim Korrekturlesen bei Andreas Renner, Annemarie Koch, Katherina Hemmen, Maria Bous, Mykola Dimura, Peter Zentis, Ralf Kühnemuth,

Sindbert Simon, Stefan Marawske, Thomas Peulen, und meinem Bruder Dimitri Dörr.

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

Großer Dank gilt meiner Mutter für das solide Fundament auf dem ich meine bisherigen Lebensabschnitte aufbauen konnte.

Ich möchte mich auch bei dem Rest meiner Familie bedanken für Ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Mein Größter Dank gilt meiner Lebensgefährtin Nana. Ohne ihre Geduld und liebevolle Unterstützung, wäre das alles nicht möglich gewesen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Promotion mit dem Thema

„Untersuchung des Einflusses der Matrix und photoprotektiver Additive auf die Eigenschaften von Fluorophoren mittels 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 vorliegenden oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

Es existieren keine vorherigen Promotionsversuche.

Ort, Datum

Unterschrift

Manuskripte

Tuning microfluidic mixers for ultrasensitive kinetic measurements using FCS and numerical methods

Denis Doerr¹, Shawn H. Pfeil², Everett A. Lipman³ Deborah Sandrin¹, Claus A. M. Seidel¹,
Ralf Kühnemuth¹

¹Institute of Physical Chemistry II, Heinrich-Heine-University, Duessldorf, Germany.

²Department of Physics, University of California, Santa Barbara, California 93106, USA

³Penn Muscle Institute Philadelphia, Pennsylvania, United States

Introduction

The usage of lab-on-a-chip approach in research and industrial applications has accentuated the need for tools that can investigate flow inside of a microfabricated device. One approach for calculating the flow in microchannels is Computational fluid dynamics (CFD) [1]. However the fabrication precision of microchannels together with often unknown liquid properties limits the accuracy of numerical calculations. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) experimental approach can probe the flow velocity in micro channels directly. The characterization of flow pattern by FCS is limited by photon statistics [2] and positioning accuracy of the confocal volume in the microchannels. At the same time the characterization of the flow pattern by FCS demands many single FCS measurements. The complementary combination of CFD with FCS overcomes most of the limitations of both methods. Thus a small number of FCS measurements provide necessary information for accurate numerical calculation of the flow pattern. Vice versa the knowledge of the flow velocity in combination with FCS can provide accurate information about diffusion coefficients of fluorophors, viscosity of a flowing liquid and the actual position of the confocal volume inside of a microchannel.

In addition to diffusive properties of investigated compounds the minimum number of photons, which is needed to select and analyze a single molecule signal defines the appropriate flow velocities for measurements in the micromixer [3]. Indeed increasing of flow velocity will doubtlessly decrease detectable number of photons from single molecules by reducing their mean dwell times in the observation volume. Hence knowledge of flow induced shortening of the dwell time is essential to estimate the possible capabilities of microfluidic mixer for kinetic measurements under single molecule detection (SMD) conditions. At the same time there are no simple analytical solutions for dwell times calculation for single molecules if both diffusion and directed flow are contributing to molecular motion [4]. Therefore we performed Brownian

dynamics simulations to calculate directly shortened dwell times under different flow conditions. Additionally we demonstrate a strategy which allows to compensate the flow induced photon loss in single molecules measurements using high excitation power together with a dark state quencher AAZBC (4-[(4-Aminophenyl)diazenyl]benzoic acid).

Theory

Pressure and Flow in Rectangular Channels

Since the late 1990s microfabricated diffusive mixers have found applications in a growing number of chemical and biochemical kinetics assays [3, 5-9]. Microfabricated diffusive mixers require only microliters of a sample and the use of a laminar flow allows to decouple laboratory time from the reaction progress. These attributes make them ideally suited for kinetic measurements with single-molecule sensitivity. The time resolution is set by the time required to diffusively mix and the dwell time needed to detect a given number of photons. Doubtless the exact knowledge of the flow pattern in the microchannels is necessary for performing kinetics measurement in micromixers.

For small Reynolds numbers the flow can be described by Poiseuille's law [10]. Thus for channels with constant rectangular cross section, there will be a linear relationship between the driving pressure gradient dp/dx and the volume flow rate Q [5, 11]:

$$Q = -\frac{dp}{dx} \cdot \frac{h^3 \cdot w}{12 \cdot \eta} \cdot \left(1 - \frac{192 \cdot h}{\pi^5 \cdot w} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \cdot \tanh \left[(2n-1) \cdot \frac{\pi \cdot w}{2 \cdot h} \right] \right) \quad 1$$

Here the flow is positive in x direction, η is the fluid viscosity, h is the channel height and w is the channel width.

Summing up the constants in equation 1 yields an expression similar to Ohm's law [6]

$$Q = \frac{\Delta p}{R_h} \quad , \quad 2$$

where Δp is the pressure drop along the length of the channel Δx and R_h is the (channel dimensions dependent) hydro dynamical impedance.

$$R_h = \frac{\Delta x}{\frac{h^3 \cdot w}{12 \cdot \eta} \cdot \left(1 - \frac{192 \cdot h}{\pi^5 \cdot w} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \cdot \tanh \left[(2n-1) \cdot \frac{\pi \cdot w}{2 \cdot h} \right] \right)} \quad 3$$

The flow profile inside a rectangular channel can be described by equation 4 [5, 11]

$$u(y,z) = -\frac{dp}{dx} \cdot \frac{1}{2\eta} \cdot \left(\frac{h^2}{4} - z^2 + \frac{8}{h} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{\left(\frac{\pi}{h} \cdot (2n-1)\right)^3} \cdot \frac{\cosh\left[\frac{\pi}{h} \cdot y \cdot (2n-1)\right]}{\cosh\left[\frac{\pi}{h} \cdot \frac{w}{2} \cdot (2n-1)\right]} \cdot \cos\left[\frac{\pi}{h} \cdot z \cdot (2n-1)\right] \right) \quad 4$$

where $u(y,z)$ is the space dependent flow velocity (with $u_{\max}$ being the fastest flow velocity in the central streamline). Thus the flow profile is dependent on the width-to-height aspect ratio ε . For $\varepsilon = 1$ the flow profile along the width (in y -direction) as well along the height (in z -direction) is parabolic. This is in contrast to $\varepsilon \ll 1$ where the flow profile in y -direction becomes plug-like [5].

FCS Measurements of flow velocity

FCS analyses spontaneous fluorescence intensity fluctuations of fluorescent molecules excited in a focused beam [12-14]. This fluctuation may be caused by a broad range of dynamic processes at the molecular level. Generally the normalized fluorescence autocorrelation function $G(t_c)$ for a fluorescence signal $F(t)$ is defined by:

$$G(t_c) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + t_c) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad 5$$

and corresponds to the probability to detect a fluorescence photon at time $(t + t_c)$ after another photon was detected at time t [12-14].

The idea to use FCS for flow measurements was first presented by Elson and Magde [13]. In a later work Gösh et al. [15] realized mapping of the laminar flow field across a $50 \times 50 \mu\text{m}$ sized channel using FCS and tetramethylrhodamine as a fluorescence reporter. The correlation function for molecules driven by directed flow is given by [16]:

$$G(t_c) = \exp\left(-\left(\frac{t_c}{t_f}\right)^2\right) \quad 6$$

$$u = \frac{\omega_0}{t_f} \quad 7$$

where t_f is the averaged time needed for flow-driven molecules to pass the detection volume, u is the average flow velocity in the detection volume and ω_0 is the distance from the center of the detection volume in the radial direction at which the detected fluorescence intensity has dropped by a factor of $1/e^2$.

Usually further processes like diffusion and triplet formation have to be considered to interpret FCS measurements. In case of a 3-D Gaussian detection efficiency distribution, the correlation function for freely diffusing molecules can be described by [17]:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \cdot \left(\frac{t_c}{t_D} \right)}} \right) \quad 8$$

$$\omega_0 = \sqrt{4 \cdot D \cdot t_D} \quad 9$$

where N is the average number of diffusing molecules in the confocal detection volume, t_D is the average time the diffusing molecules need to pass the detection volume, D is the diffusion coefficient, and z_0 is the distance from the center of the detection volume in the axial direction at which the detected fluorescence intensity drops by a factor of $1/e^2$. The correlation function for singlet-triplet fluctuations with characteristic triplet time t_T is calculated by [17]

$$G(t_c) = \exp \left(- \frac{t_c}{t_T} \right) \quad 10$$

The correlation function which includes a two dimensional flow, diffusion and triplet formation can be described by [17, 18]

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \cdot \left(\frac{t_c}{t_D} \right)}} \right) \cdot \exp \left(- \left(\frac{t_c}{t_f} \right)^2 \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \right) \cdot \left(1 - T + T \cdot \exp \left[- \frac{t_c}{t_T} \right] \right) \quad 11$$

where T is amplitude of the triplet term.

Note: the diffusion term amplitude of equation 11 is equivalent to the inverse mean number of all fluorescent molecules (N_{all} , see equation 13) in the confocal volume [19, 20], which can be used to calculate the mean fluorescence count rate (F_{cpm}) for single molecule:.

$$F_{cpm} = \frac{S_F}{N_{all}} \quad 12$$

$$N_{all} = \frac{N}{(1-T)} \quad 13$$

where S_F is fluorescence signal.

Taking into account the effect of backgrounds at amplitude of diffusion term [21], the equation 14 can be used for calculation of background corrected F_{cpm}

$$F_{cpm} = \left(\frac{S_F - S_B}{N_{all}} \right) \cdot \left(\frac{S_B}{S_F} + 1 \right)^2 \quad 14$$

where S_b is background signal

Material and Methods

Four-terminal Lumped Impedance Model for Microfluidic Mixer

In this work we will focus on a micromixer with mainly rectangular channels, where the height h is always 10 μm and the channel widths w vary between 5 and 50 μm . The laminar flow of the sample solution was generated by applying a pressure gradient between the inlets and the outlet of the micromixer (the discussed micromixer is described in detail by Pfeil et al. [3]).

Because of the mixing neck length ($l = 30 \mu\text{m}$ see Figure 1 B) and a diffusion coefficient of small organic compounds in the range of 0.3-1 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ the maximum flow velocity in the mixing neck should be smaller than 10 $\mu\text{m}/\text{ms}$ to assure proper mixing of reactants. Accordingly for a given range of channel dimensions and applied flow velocities the estimated Reynolds number for an aqueous solution are $R_e \approx 10^{-2}$ (see equation 15), for $R_e \ll 1000$ the flow is always within the laminar range.

$$R_e \equiv \frac{u \cdot d \cdot \rho}{\eta} \quad 15$$

where η is the water viscosity, ρ the water density and d the channel diameter. For rectangular channels d can be approximated by the smaller dimension.

Due to the fact that the impedance of non-rectangular shaped channels parts (middle of mixer Figure 1 A) is negligible in comparison to the rectangular channel parts [3], the four-terminal lumped impedance model [3-6] (analogous to Kirchhoff's circuit laws) can be applied to the mixer (Figure 1 B). According to this model the volume flow rate in the observation channel Q_O is dependent on the pressure drop between middle inlet and outlet $\Delta P_M = P_M - P_O$ and the impedances of the channels [3]:

$$\Delta P_M = (R_O + R_M \cdot m) \cdot Q_O \quad 16$$

The mixing ratio m is dependent on the ratio of P_S to P_M and can be calculated according to equation 17 [3]:

$$m = \frac{1 - 2\sigma \left(1 - \frac{\Delta P_S}{\Delta P_M} \right)}{1 + 2\gamma \frac{\Delta P_S}{\Delta P_M}} = \frac{Q_M}{Q_O} \quad 17$$

where $\sigma = R_O/R_S$, $\gamma = R_M/R_S$ and $\Delta P_S = P_S - P_O$. For defined inlet and outlet pressures the equations 16 and 17 can be used for calculation of the volume flow rate in the developed flow area (see Figure 1 B) of the observation channel. For practical purposes expression of equation 16 using the experimentally observable flow velocity $u(z,y)$ is desirable:

$$\Delta P_M = (R_O + R_M \cdot m) \cdot u(z,y) \cdot \beta(z,y) \quad 18$$

Here $\beta(z,y)$ is the ratio between volume flow rate Q_O and flow velocity $u(z,y)$ which can be obtained by numerically solving the division of equation. 1 and equation 4.

Due to precision of the fabrication process for the presented micromixer of about $1 \mu\text{m}$ [3] the channel dimensions can deviate systematical from the specified one. However using confocal scans we did not observe any significant deviation of channel dimensions. Considering the lateral and axial resolutions of our confocal scans of 0.3 and $0.5 \mu\text{m}$ respectively we gain a maximum systematical error for the calculated flow velocity of $\pm 2.5\%$.

Computational Fluid Dynamics Calculations

Due to width difference of mixing and observation channels the flow profile will change within the first $40 \mu\text{m}$ of the observation channel. There is no analytical solution for the relationship between flow and pressure drop in this region [3]. The flow and pressure for this region are numerically calculated using the CFD software tool OpenFOAM (<http://www.openfoam.com/>). Assuming an incompressible liquid and solving the Navier–Stokes equation within the 3D geometry of a simulated area (Figure 1 C) yields the velocity field $u(x, y, z)$ and pressure field $P(x, y, z)$ at any point. A small enough grid size was chosen, based on the comparison of results from a succession of finer meshes, to ensure that the results are independent of the grid. The density of the fluid was assumed to be 1000 kg/m^3 and the dynamic viscosity was set to 1 mPa s . In

order to reduce computing time the simulation was performed for only a small section of the micromixer.

To achieve quantitative results from numerical calculations the pressure drop along the simulated section needs to be aligned to the pressure drop along the entire mixer consistent with realistic experimental conditions. Due to the fact that lengths of side and middle inlets within the simulated section are infinitely small the hydro dynamical impedances for inlets become also infinitely small. If the impedance ratio γ is conserved and the inlet pressures are equal ($P_{Ssim} = P_{Msim}$), equation 16 can be modified for the simulated section:

$$\Delta P_{sim} = R_{sim} \cdot Q \quad 19$$

where ΔP_{sim} and R_{sim} are pressure drop and hydrodynamic impedance for the whole simulation section, respectively.

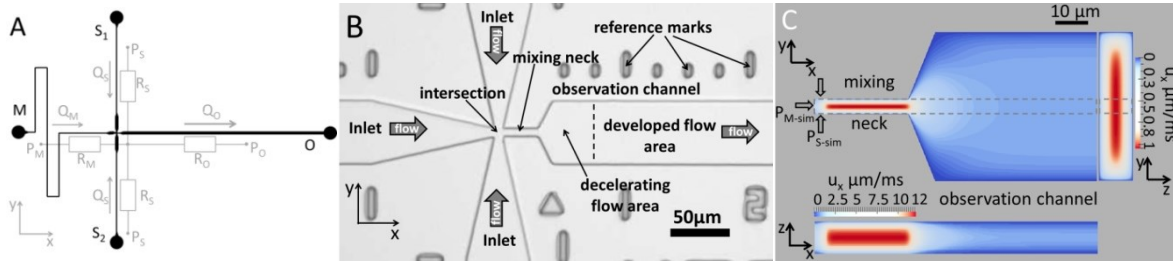


Figure 1 A: Scheme of micromixer (black), where M is the 5 μm wide and 8 mm long middle inlet, S 1, 2 are the 6 μm wide and 5.3 mm long side inlets and O is the 50 μm wide and 11 mm long observation channel. The height of all channels is 10 μm . Grey shows a four-terminal lumped impedance model for this micromixer, where the volume flow rate Q is proportional to the pressure drop ΔP and inversely proportional to the impedance R

B: Photograph of the microfluidic device's mixing region. Inlet channels narrow to a 5 μm wide and 5 μm long intersection followed by a 5 μm wide and 30 μm long mixing channel. The mixing channel expands into the 50 μm wide observation channel. The first short and first long oval shaped reference marks display 20 μm and 70 μm distance from mixing neck, respectively. The triangle shaped reference mark (located on the picture below the observation channel) indicates 10 μm distance from the mixing neck.

C: Simulated section of the mixing region, consisting of intersection followed by mixing neck which widens into a 70 μm long observation channel. The grid size was chosen to be $\Delta x = 0.5 \mu\text{m}$ and $\Delta y = \Delta z = 0.25 \mu\text{m}$, in the part of the simulated section highlighted with grey dashed line and to be $\Delta x = 0.5 \mu\text{m}$, $\Delta y = 1 \mu\text{m}$ and $\Delta z = 0.25 \mu\text{m}$ in the remaining part of the simulated section. Upper part, bottom part and right upper part represent the flow profile in the x,y-plane at channel half height, the flow profile in x,z-plane at channel half width, and the flow profile in z,y-plane in the observation channel 70 μm downstream from the mixing channel respectively. The pressure drop between inlets and end of simulation section was set to 0.153 kPa.

In order to calculate R_{sim} a CFD simulation with an estimated hydro dynamical impedance of $R = 508 \text{ kPa}\cdot\text{s/nL}$ (= summarized impedance of two rectangular channels representing the simulated section with dimensions $l \times w \times h$ of 35 $\times$ 5 $\times$ 10 μm and 70 $\times$ 50 $\times$ 10 μm , respectively) was performed. For a fixed pressure drop of 0.153 kPa we thereby estimated the volume flow rate of 0.301 nL/s (equation 19). CFD simulation yielded a volume flow rate of 304 nL/s using the same pressure drop and $R_{sim} = 0.503 \text{ kPa}\cdot\text{s/nL}$ as obtained from equation 19 Figure 1). Inserting the obtained R_{sim} together with Q_o (as derived from equation 16) into equation 19 yields the

pressure drop in the simulated section. This allows us to use the CFD simulation to calculate flow pattern in the analytically inaccessible mixing neck and the initial part of observation channel (deceleration area in Figure 1 B) under experimental conditions.

Fluorescence correlation Spectroscopy

To map the flow in the observation channel, FCS measurement on rhodamin 110 (rh 110) in water was performed using a home-built setup [22]. In this setup a mode-locked argon-ion-laser (Innova Sabre, Coherent) coupled to an inverted epifluorescence confocal microscope (Olympus, IX71) is used to generate linearly polarized and pulsed light at 496.5 nm and a repetition rate of 73.5 MHz. Using a water immersions objective (UPLAPO 60 NA = 1.2, Olympus, Hamburg) to focus the excitation light at the sample we apply a mean intensity of $I_0/2 \sim 25 \text{ kW/cm}^2$ in a focus which is close to the diffraction-limit (see explanation below). The fluorescence was separated in the parallel and perpendicular polarization compounds with respect to the excitation polarization. The fluorescence beam is finally focused on the single-photon avalanche diodes (Photon counting Module SPCM-AQR-14, Perkin Elmer). The detector signals were recorded by a hardware-correlator (ALV-7004). For each FCS measurement 20-25 million photons were collected. In order to position the confocal volume inside of the micro channels a piezo-stage (Physik Instrumente, P-527) together with a CCD camera (CCD, DV887 ECS-BV, Andor) were used. For FCS measurements the microfluidic system was aligned in a way that the flow in the observation channel was always perpendicular to the optical axis of the fluorescence setup. The confocal volume was always placed in the middle of a channel with respect to channel height and channel width, the position being estimated using reflections from the coverglass-water and water-PDMS interface. In addition the etched reference marks (Figure 1 B) were used to estimate the position along of the observation channel. The confocal volume size was calibrated using the known diffusion coefficient ($D=4.4 \cdot 10^{-6} \pm 0.3 \text{ cm}^2/\text{s}$ at 22.5° C) [23] of rhodamine 110 in water. The radial extend of the confocal volume was $\omega_0 = 0.24 \pm 0.008 \text{ }\mu\text{m}$ and the axial extend $z_0 \approx 1 \text{ }\mu\text{m}$ [24]. Considering the flow profile in the observation channel ($\varepsilon = 5$, plug-like along the width and parabolic along the height) together with the spatial extend of the confocal volume the flow velocity in the central streamline measured by FCS is estimated to be $u_{\text{FCS}} = u_{\text{max}} \cdot 0.99$.

Single molecule measurements

The single molecule measurements were performed on similar setup as used for FCS measurements. There multi parameter fluorescence detection (MFD) was performed, where pulsed excitation and time-correlated single photon counting is applied to measure simultaneously fluorescence intensity and lifetime [25-28]. Two synchronized time-correlated single photon counting pc-boards (Becker & Hickl, SPC-150), were used to record macrotime Δt , micro time $\Delta \tau$ (time between detected photon and next laser pulse) and channel number (detector where the photon was detected) for each detected photon. In order to obtain more photons from single molecules the confocal volume was increased ($\omega_0 = 0.59 \pm 0.02 \mu\text{m}$ and $z_0 \approx 2.5 \mu\text{m}$) in comparison to the FCS measurements. In order to simplify single molecule experiments we used a commercially available flow chamber (*sticky-Slide 1 Luer*, ibidi) with channel height, length and width of 0.1 mm, 5 mm and 48 mm, respectively, instead of the microfluidic mixer. As driving force for the flow in the chamber the fluid level difference between syringes connected to outlet and inlet of the flow chamber was used (see SI for scheme of simplified flow set up). The flow velocity in the channel was calibrated using FCS.

Separation of singlemolecule events from background signal

The rhodamine 123 in phosphate buffer (20mM pH 7) with a concentration around 10 pmol was used to perform single molecule measurements. Due to the small concentration of rh 123 most of the time no molecules pass through the confocal volume, hence the signal consist of background photons with typical mean time lag between detected photons of $\langle \Delta t \rangle = 0.5 \text{ ms}$ (for total laser intensity of 130 μW [29-31] which corresponds to mean power density of $\langle I \rangle \sim 24 \text{ kW/cm}^2$ as used for typical single molecule measurements). If one of the rh 123 molecules is located inside of the confocal volume, the mean time lag between the photons drops to $\langle \Delta t \rangle = 0.01 \text{ ms}$. Nevertheless is the efficient separation of fluorescence signal from background signal difficult due to the strong fluctuations of the Poisson distributed background signal [25, 27, 30, 32] (see Figure 2 B). However the fluorescence signal from single molecules appears as a clearly defined minimum in a plott of time lags between consecutive photons versus photon event number $n\#$, if the signal is smoothed by a running mean (equation 20) with the appropriate averaging window [27, 30, 32] (see Figure 2 A).

$$\Delta t_{sm} = \frac{1}{2m+1} \cdot \sum_{j=-m}^m \Delta t(n\# + j) \quad 20$$

By applying an appropriate threshold (Δt_{th}) and defining a minimum number of photons n_{th} below the threshold to the smoothed time lag data (Δt_{sm}) it is possible to separate efficiently background signal from fluorescence signal of single molecule events (fluorescence bursts), which can be analyzed afterwards [27].

Finally the smoothing is used to estimate the event numbers of first and last photons (see photons which are highlighted by blue and green color in Figure 2 A) of each fluorescence burst. The actual selection takes place on the original data, where each fluorescence burst is defined by all photons whose event numbers are located between the previously determined first and last photon. In some cases the scope for changing the threshold value Δt_{th} was found to be not sufficient for proper burst selection. Especially for small fluorescence signal to background signal ratios (see high power measurements) we used an additional option (n_+) for burst selection, where a certain number of photons was added to each selected burst. Thereby the event numbers of first and last photons for each selected burst were decreased or increased by the same value, respectively.

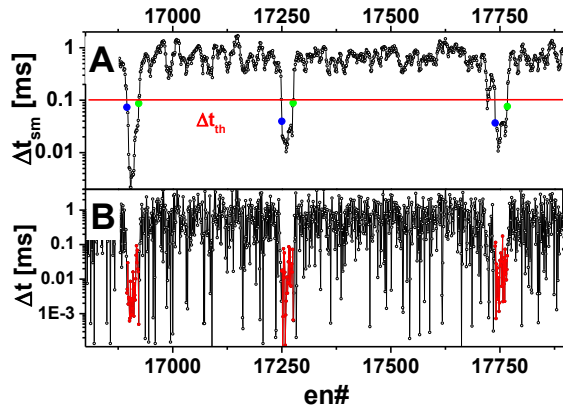


Figure 2 A: Selection of the fluorescence bursts in a single molecule measurement of rh 123 in phosphate buffer, using the time distance between consecutive photons.

A: smoothed data Δt_{sm} versus the photon event number $n\#$, where an averaging window with $m=5$ (see equation 20) is applied. Threshold value, $\Delta t_{th}=0.1$ ms (red line) together with the minimum number of consecutive photons below threshold, $n_{th}=10$, are set to be selection criteria for fluorescence bursts. The first and the last photon of selected fluorescence bursts are highlighted by blue and green dots respectively.

B: the originally recorded Δt plotted versus signal event number $en\#$. Red color highlights selected photons (whose event numbers are located between blue and green highlighted photons in the picture above).

Comparison of burst size distribution between measurements under different conditions

In single molecule measurements with high fluorescence to background signal ratio the burst selection procedure should have negligible influence on burst duration distributions ($t_B D$) within a

wide range of threshold values Δt_{th} and n_{th} [33]. However the distribution of fluorescence photons per burst ($N_F D$), which is the distribution of burst sizes, is strongly dependent on threshold values Δt_{th} and n_{th} especially in measurements with high background (measurements with AAZBC) and high flow measurements (where the bursts consist of only a few photons). Therefore the threshold values need to be adapted carefully to avoid the artifacts of burst selection procedure (see SI).

To estimate the number of fluorescence photons (N_F) in each burst a mono-exponential model was fit to photon arrival time histograms of each selected burst which gains the fraction of background photons (γ) (see SI). Subsequently γ is used to calculate N_F in each burst according to equation 21:

$$N_F = n_B - (n_B \cdot \gamma) \quad 21$$

Concerning the FCS measurements, where t_D is independent of the excitation power if the dark state quencher is added to the dye solution and F_{cpm} is independent of the flow velocity, we assume fluorescence burst duration and fluorescence countrate in the burst to be independent from excitation conditions and flow velocity respectively. Thereby the fluorescence countrate in each burst is calculated using equation 22:

$$F_B = \frac{n_B}{t_B} - F_{back} \quad 22$$

where n_B is the number of photons in the selected burst and F_{back} is the countrate of background.

To characterize distributions of F_B or N_F the arithmetic mean, which is calculated according to equation 23, was used

$$\langle X \rangle = \frac{\sum_{i=0}^i X_i \cdot N_{Bi}}{\sum_{i=0}^i N_{Bi}} \quad 23$$

where X corresponds to F_B or N_F and N_B is number of bursts.

Following Fries et al. [27] in single molecule measurements without flow the decay constant of a mono exponential fit to $t_B D$ gains the mean burst duration ($\langle t_B \rangle$) from selected burst, if only single molecule events are selected with molecules diffusing through the entire three-dimensional detection volume. Thereby $\langle t_B \rangle$ is connected to t_D (which is defined by FCS theory, see equations 8 and 9) by equation 24 [34]:

$$\langle t_B \rangle = \frac{4}{3} t_{D(FCS)} \quad 24$$

Finally in experiments without flow it is possible to use t_D from FCS measurements to select the single molecule bursts in a reproducible way. Subsequently distributions of t_B or F_B are used to

adapt the threshold values for corresponding measurements under different measurement conditions.

Brownian dynamics simulation

The simulations were done with custom made C++ program, introduced previously [29]. Briefly to simulate single molecule signals we let “molecules” diffuse freely in an open ellipsoidal shaped volume with radii in radial and axial directions of 6 μm and 24 μm respectively (which is 10 times bigger in comparison to the confocal volume in our experiments (with $\omega_0=0.6 \mu\text{m}$ and $z_0=2.4 \mu\text{m}$ by 3-D Gaussian distributed excitation intensity)). Because the molecules are allowed to leave the simulation volume the new molecules need to be continuously added to keep the concentration constant. The average number of molecules in the simulated volume was chosen to 0.75, thereby the average number of molecules inside of the FCS volume was 0.001. To model diffusion, normally distributed random numbers Δx , Δy and Δz were added to the x, y and z coordinates of each molecule, respectively, at each time step Δt , where $\langle \Delta x^2 \rangle = \langle \Delta y^2 \rangle = \langle \Delta z^2 \rangle = 2D \cdot \Delta t$. Additionally in order to model x-directed flow at each time step the flow component Δx_{fl} , which is defined as $\Delta x_{fl} = \Delta t \cdot u$ (where u is the flow velocity), was added to the x coordinate. For all simulations the time step was chosen to be $\Delta t = 0.005 \text{ ms}$ and the diffusion coefficient to be $D = 0.43 \mu\text{m}^2/\text{ms}$. Additionally a Poisson distributed background with mean intensity of 2 kHz was modelled for each flow velocity.

The TCSPC data was generated assuming pulsed excitation with repetition rate of 13.56 MHz and a Gaussian excitation pulse profile with an FWHM of 0.3 ns, whereas the fluorescence decay time was chosen to be 4 ns. The average number of photons emitted by a molecule at each time step is given by

$$\langle F \rangle = I(x, y, z) \cdot \Phi_{sim} \cdot \Delta t \quad 25$$

where Φ_{sim} is brightness of molecules, I is space dependent excitation intensity.

In the center of the simulated volume, where the maximum of excitation intensity is located, Φ_{sim} was chosen to be 1700 kHz. Additionally a Poisson distributed background with mean intensity of 2 kHz was modelled for each flow velocity.

Results and Discussions

FCS measurements

Calibration of transport properties using FCS measurements

Equation 11 was fit FCS data (example in Figure 3 A), where t_D and t_f were obtained as fit parameter. In the developed flow area of the observation channel at flow velocities between 0.6-3 $\mu\text{m/ms}$ and if the confocal volume is not moved between the measurements we observe very stable values for both t_D and t_f with small fluctuations in the range of $\Delta t_D \approx 1\%$ and $\Delta t_f \approx 2\%$. At low flow velocities ($u < 0.5 \mu\text{m/ms}$) where $t_f > 10 \cdot t_D$ the estimated t_f becomes arbitrary uncertain, at the same time the fluctuations for t_D became smaller and approximated $\Delta t_D = 0.5\%$ by measurements without flow. In measurements with higher flow velocities ($t_f \approx t_D$) the uncertainty of t_D increases to approximately $\Delta t_D \approx 10\%$. Hence we set t_D as well as the ratio z_0/ω_0 to fixed values as obtained from the measurement without flow. Additionally we observe bigger fluctuations of t_f ($\Delta t_f = 5\%$) if the position of the confocal volume is changed between measurements; therefore five FCS measurements at different positions along the central streamline (more than 60 μm away from the mixing neck), for each pressure were performed in order to generate y-error bars shown in Figure 3. Both t_D as well as t_f are connected by ω_0 to the passive (diffusion) and active (flow) transport parameter of rh 110 respectively (see equations 7 and 9). The inaccuracy due to estimation of ω_0 was found to be the largest source of systematic errors in transport properties measurements using FCS [2, 35, 36]. However solving equation 7 for ω_0 and inserting in equation 9 leads to equation 26, where ω_0 is not relevant.

$$u \cdot t_f = \sqrt{4 \cdot D \cdot t_D} \Rightarrow \frac{t_f^2}{4 \cdot t_D} = \frac{D}{u^2} \quad 26$$

Hence we can avoid the erroneous estimation of ω_0 and estimate diffusion coefficients directly from the linear slope of the plotted $t_f/(4 \cdot t_D)$ against u^{-2} (Figure 3 D).

Using FCS measurements in the developed flow area of the observation channel and calculated according to equation 18 flow velocities we gain a diffusion coefficient for rh 110 of $D_{\text{rh110}} = 0.44 \cdot 10^{-6} \pm 0.04 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ which is in perfect agreement with the value of $D_{\text{lit}} = 0.44 \cdot 10^{-6} \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ as measured by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance spectrometry [23].

Alternatively the linear slope from measured t_f plotted against u^{-1} gains directly $\omega_0 = 0.24 \pm 0.01 \mu\text{m}$ (see equation 7 Figure 3 C).

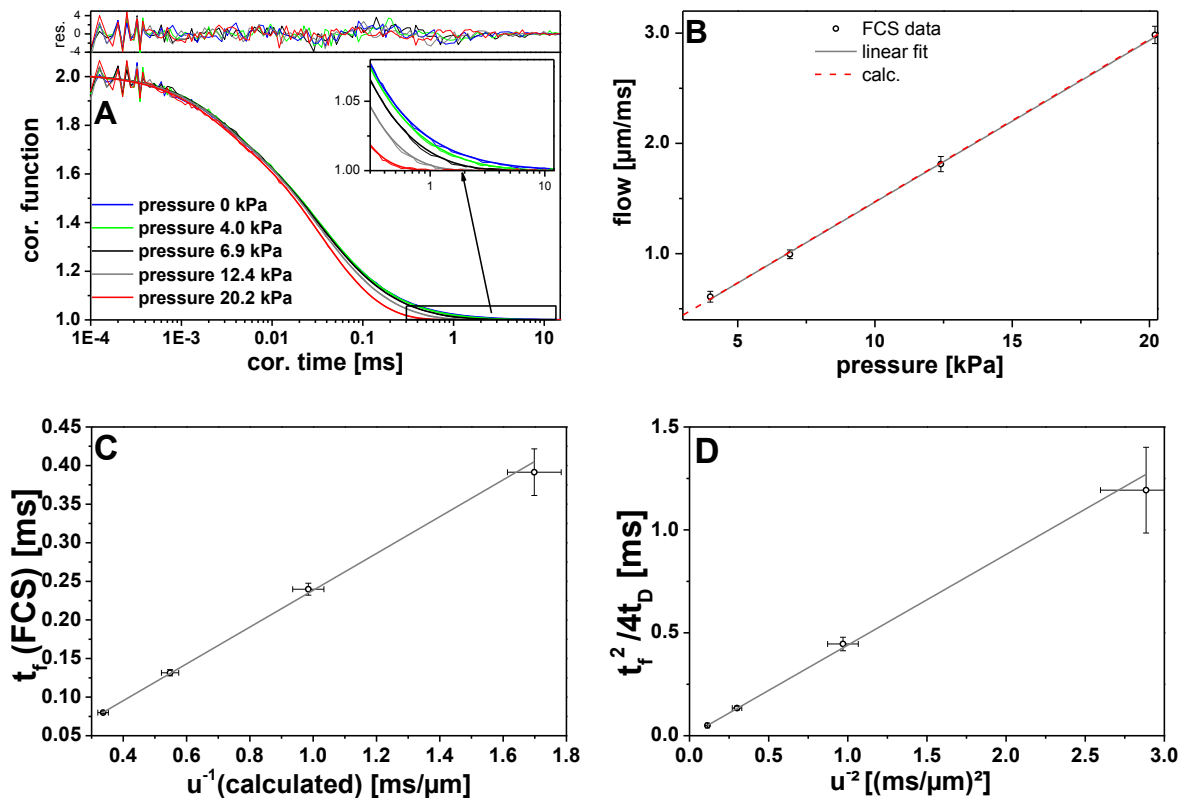


Figure 3 FCS measurements of flow velocities in developed flow area ($<50\mu\text{m}$ from mixing neck). A: Normalized FCS curves of rh 110 in water. The measurements were taken $60\mu\text{m}$ downstream in the middle (with respect to height and width) of the observation channel. The inlet pressures (equal at all inlets) are applied relative to the outlet. The fit (equation 11) provides flow velocities (equation 7) of 0, 0.65, 1.05, 1.82, and $3.06\mu\text{m/ms}$ for the corresponding pressures.

B: Plot of flow velocities, calculated according to equation 7, against applied pressure. Each black dot represents the average of five FCS measurements at the same flow velocity. The grey line represents a linear fit to averaged points (slope = $14.7 \pm 0.3\mu\text{m}\cdot\text{ms}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$), red dashed line represents the flow velocity as calculated according to equation 18 (slope = $14.77\mu\text{m}\cdot\text{ms}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$).

C: Plot of t_f against inverse flow velocity calculated according to equation 18, where the linear slope (grey line) represents ω_0 .

D: Plot of $t_f^2/4t_D$ against u^2 , where the linear slope (grey line) represents the diffusion coefficient of rh 110 (see equation 26). The x-error bars represent the flow deviation due to uncertainty of channel dimension estimation.

Finally if the reported diffusion coefficient [23] $D = 0.44 \cdot 10^{-6} \pm 0.03\mu\text{m}^2/\text{ms}$ is used to calibrate the size of confocal volume, the comparison between theoretically calculated and experimentally observed flow velocities (red dashed and grey lines in Figure 3 B respectively) yields no deviation within the accuracy of our measurements.

Calibration of confocal volume position using FCS measurements and calculated flow pattern.

The FCS measurements in the initial part of the observation channel (deceleration area) shown in Figure 4 A agree well with the respective CFD simulations. However, the measured flow velocities at shorter distances from the mixing neck ($10\text{--}30\mu\text{m}$) were often systematically shifted to lower or higher values with respect to CFD simulations (see Figure 4 C). The points measured

in the developed part of the flow are usually distributed around the calculated flow velocity. The most likely explanation for such systematic deviation of the flow velocities only in the deceleration area is a misalignment of the confocal volume in x-direction of the observation channel. Due to optical reflections from opposite sidewalls in the 4 μm wide reference marks together with Bosch-process conditioned sidewall roughness [37] the precise position along the central streamline is difficult to estimate (approximate precision $\pm 1 \mu\text{m}$).

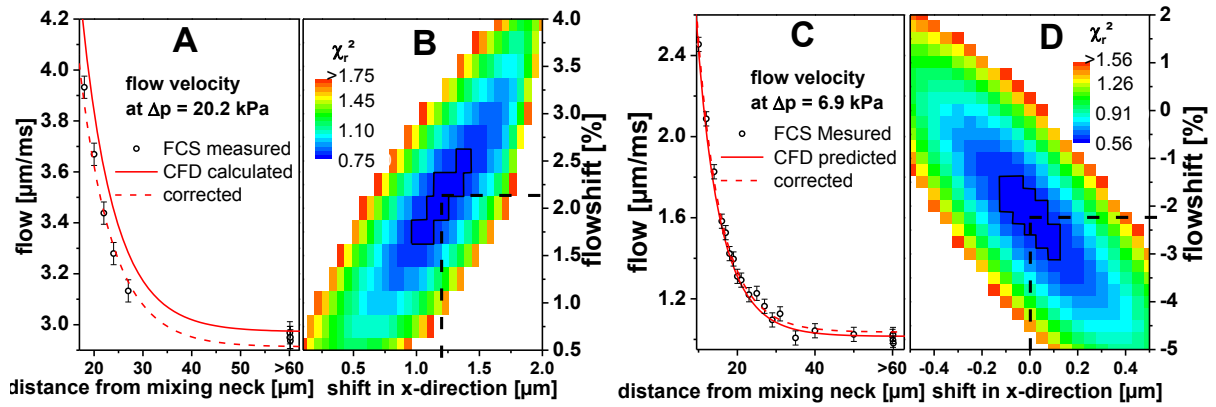


Figure 4 A, C: Flow velocities of central streamline in the decelerating area of observation channel as obtained by FCS and the corresponding CFD simulations (red lines), with pressure drop between inlets and outlet of 6.9 kPa and 20.2 kPa respectively. The error bars represent the standard deviation of 5 measured flow velocities in the developed flow area. The dashed red lines represent the calculated flow velocity, where the minimum of the χ_r^2 surface plot shown in B and D is considered.

B, D: reduced χ_r^2 plots calculated according to equation 27. The crossing of black dashed lines indicates the minimum of each χ_r^2 plot, where the black contour lines border the minimum within the confidence level of 5 %.

To circumvent this uncertainty we can obtain a more accurate x position using reduced χ_r^2 which depends on the relative x-position and the flow velocity in comparison to a simulated values and is calculated according to equation 27:

$$\chi_r^2 = \sum_{-i}^i \sum_{-j}^j \sqrt{\frac{(u_{FCS} - u(i, j))^2}{\sigma^2}}, \quad 27$$

where u_{FCS} is the flow velocity as measured by FCS, $u(i, j)$ the flow velocity calculated by CFD, the flow offset, x-position shifted by i, and σ^2 is the standard deviation of measured flow velocities in the developed flow area.

(Note: that a position mismatch in y direction would have negligible effect on the measured flow velocity due to the mainly plug-like flow profile, and that the position of the confocal volume in z direction can be precisely adjusted (diffraction limit $< 0.5 \mu\text{m}$) using the reflection from the relatively smooth coverglass-water interface at the channel bottom (estimated effect on measured flow velocity $< 1\%$).

Figure 4 C demonstrates the measurement in the central streamline of the deceleration area where we observe no systematical deviation of the measured flow velocities (empty dots) from the

calculated ones (red line). The corresponding minimum in the χ_r^2 surface plot (Figure 4 D), gains no shift of x-position within the limits of $\pm 0.12 \mu\text{m}$ for a confidence level of 5 %. However the measurements in Figure 4 A show a clear systematical deviation of measured flow velocities where the corresponding χ_r^2 surface plot (Figure 4 B) indicates a shift for the estimated x-position of $\Delta x = 1.2 \pm 0.23 \mu\text{m}$ for the same confidence level.

Single molecules

Flow induced decrease of burst size.

MFD experiments yielded t_B and N_F distributions as shown in Figure 5. Here, for higher flow velocities, relatively even and towards lower duration shifted $t_B D$ were observed [38] (Figure 5 A and SI). Plotting the decay constants obtained by mono exponential fits of $t_B D$ [27] against the corresponding flow velocity yields the relation between flow velocity and dwell time of the fluorophor (Figure 6 A). Since the brightness of the fluorophors is independent of the flow velocity, the decrease of burst duration can be assumed to be proportional to the decrease of fluorescence signal (see Figure 5 and Figure 6 A).

For given settings for our simulation (which corresponds closely to our single molecule measurements) the flow velocities below $0.5 \mu\text{m/ms}$ have only weak influence on the dwell time of the fluorophor. This observation can be evaluated using FCS theory where dwell times are connected to t_D and t_f . For a given confocal volume with $\omega_0 = 0.6 \mu\text{m}$ and a diffusion coefficient of the fluorophor of $D_{\text{rh } 123} = 0.43 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ [23] the diffusion time is $t_D = 0.2 \text{ ms}$ (see equation 9). For flow velocities below $0.5 \mu\text{m/ms}$ the characteristic flow time is distinctly bigger than t_D ($t_f > 1.2 \text{ ms}$ see equation 7). Hence the influence of t_f on the correlation function (see equation 11) becomes negligible. By flow velocities above $0.5 \mu\text{m/ms}$ a fast drop of dwell times was observed. At flow velocity of $3 \mu\text{m/ms}$ the mean burst duration is almost halved.

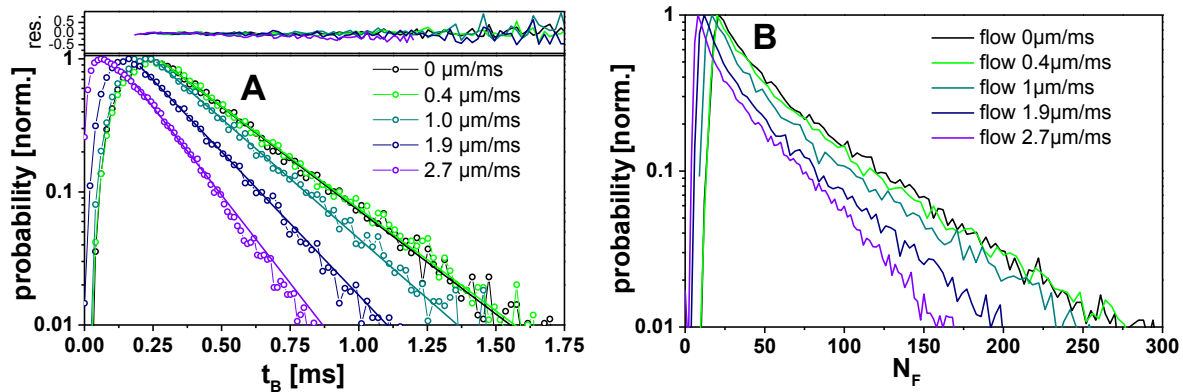


Figure 5 Burst duration (A) and fluorescence photon number per burst (B) distributions of rh 123 in phosphate buffer under different flow conditions. The mean countrate of $\langle F_B \rangle = 170$ kHz is used to adapt the burst selection algorithm for different flows (see SI).

Taking $\langle t_B \rangle$ as measure for the flow velocity induced drop of fluorescence signal from single molecules, we would observe an equal number of single molecule events, with half the amount of fluorescence photons in measurements with flow velocity of $3 \mu\text{m/ms}$, in comparison to measurements without flow. Due to the fact that a certain number of fluorescence photons is needed for proper signal analysis [39], the decrease of fluorescence photon numbers would limit inevitably the scope for single molecule measurements under flow conditions.

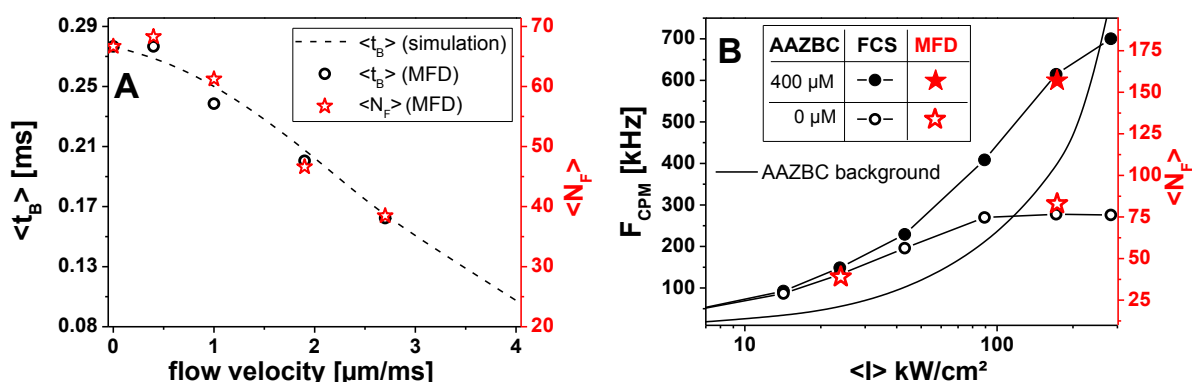


Figure 6 A: Mean burst duration $\langle t_B \rangle$ (black dots) and mean fluorescence number in burst $\langle N_F \rangle$ (red stars) plotted against corresponding flow velocities. The dashed line represents mean duration obtained by Brownian dynamics simulation.

B: F_{cpm} distribution for rh123 in phosphate buffer with 400 μM AAZBC (filled dots) and 0 μM AAZBC (open dots) measured by FCS under pulsed excitation. The red stars represent the mean number of fluorescence photons in the bursts $\langle N_F \rangle$ from corresponding single molecule measurements with a flow velocity of $u = 2.7 \mu\text{m/ms}$ (see Table 1)

Increasing burst size by application of AAZBC

Following Pfiffli et al. [40], it is possible to increase the fluorescence signal in the range of one order of magnitude by increasing excitation power if a radical and triplet state quencher (e.g. approximately 0.1-1 mM AAZBC) is added to the rh 123 solution. Thereby the achieved fluorescence signal under CW excitation was close to the maximal achievable signal for a theoretical 2-state model for an excitation and emission cycle. Therewith it should be possible to compensate the flow induced fluorescence photon loss. Hence the scope for single molecule measurements in a micromixer can be expanded closer to the limits defined by diffusive properties of the used compounds. However, single molecule measurements are often done under pulsed excitation conditions, where due to optical saturation effects [41] the maximal achievable enhancement of fluorescence signal is expected to be smaller in comparison to measurements with

CW excitation. To determine the effect of the AAZBC compound on the rh 123 fluorescence signal under pulsed excitation FCS measurements using different excitation powers without and with 400 μM of AAZBC were performed. The resulting F_{cpm} (see equation 14) plots are shown in Figure 6. Due to population of dark states, increase of excitation power above 50 kW/cm^2 in measurements without AAZBC cause no further increase of F_{cpm} . If AAZBC is added to the dye solution the saturation is shifted towards higher excitation power, so that by 400 μM concentration of AAZBC the maximum of F_{cpm} is 2.5 times higher in comparison to measurements without AAZBC. Note: by measurements under CW excitation a 5 times higher F_{cpm} is expected using the same AAZBC concentration.

To demonstrate the AAZBC effect on single molecule measurements, we performed measurements with 170 kW/cm^2 excitation power density with and without 400 μM AAZBC added to the dye solution. Thereby the burst selection procedure was adapted using the corresponding t_{B} from flow measurements without AAZBC at a power density of 24 kW/cm^2 (see SI).

Table 1 the Mean number of fluorescence photons in bursts by single molecules measurements under different conditions.

flow velocity [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$\langle I \rangle = 24 \text{ kW}/\text{cm}^2$	$\langle I \rangle = 170 \text{ kW}/\text{cm}^2$ (+400 μM AAZBC)
0	67	128 (278)
0.4	68	
1	61	
1.9	47	
2.7	38	84 (157)

The resulting N_{F} distributions are shown in Figure 7. Similar to F_{cpm} by increasing of excitation power from 24 kW/cm^2 to 170 kW/cm^2 roughly 2 times bigger $\langle N_{\text{F}} \rangle$ without AAZBC and roughly 4 times bigger $\langle N_{\text{F}} \rangle$ if 400 μM of AAZBC was added to dye solution, was observed (see Figure 6 and Table 1).

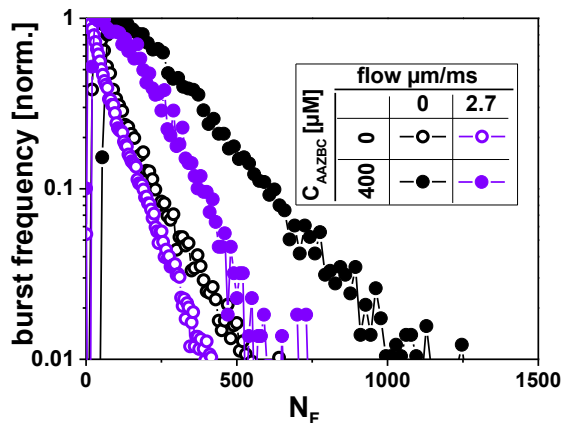


Figure 7 : Fluorescence photon number distribution of rh123 in phosphate buffer with and without 400 μM AAZBC measured under different flow conditions at excitation power densities of 170 kW/cm^2 and 24 kW/cm^2 .

Summary

FCS in combination with CFD calculations were used to describe the flow patterns in a micro sized channel. Additionally we have demonstrated the application of a known flow velocity as calibration standard for single focus FCS. Indeed using the flow velocity from FCS method as an independent degree for confocal volume size, just like the distance between two foci is used to calibrate two-focus FCS [42], we were able to estimate the exact diffusion coefficient of rh110. Furthermore to improve the time resolution of kinetic measurements in the micromixer we used the calculated flow velocity to estimate the precise position inside of microchannel.

By MFD measurement we demonstrate quantitative burst size distribution analysis under flow conditions. Additionally to extend possible capabilities of microfluidic mixers for kinetic measurements we demonstrated how to compensate the flow induced photon loss by single molecule measurements, using novel dark state quencher.

Acknowledgments

We thank S. Kalinin, S. Felekyan S. Marawske for enlightening discussions.

Literature

1. Erickson, D., *Towards numerical prototyping of labs-on-chip: modeling for integrated microfluidic devices*. Microfluidics and Nanofluidics, 2005. **1**(4): p. 301-318.
2. Brister, P.C., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy for flow rate imaging and monitoring - optimization, limitations and artifacts*. Lab on a Chip, 2005. **5**(7): p. 785-791.

3. Pfeil, S.H., et al., *A microfluidic mixing system for single-molecule measurements*. Review of Scientific Instruments, 2009. **80**(5).
4. Enderlein, J., et al., *Statistics of single-molecule detection*. Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(18): p. 3626-3632.
5. Brody, J.P., et al., *Biotechnology at low Reynolds numbers*. Biophysical Journal, 1996. **71**(6): p. 3430-3441.
6. Knight, J.B., et al., *Hydrodynamic focusing on a silicon chip: Mixing nanoliters in microseconds*. Physical Review Letters, 1998. **80**(17): p. 3863-3866.
7. Bornhop, D.J., et al., *Free-solution, label-free molecular interactions studied by back-scattering interferometry*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1732-1736.
8. Chung, K., et al., *A microfluidic array for large-scale ordering and orientation of embryos*. Nature Methods, 2011. **8**(2): p. 171-U103.
9. Lemke, E.A., et al., *Microfluidic Device for Single-Molecule Experiments with Enhanced Photostability*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(38): p. 13610-+.
10. Mala, G.M. and D.Q. Li, *Flow characteristics of water in microtubes*. International Journal of Heat and Fluid Flow, 1999. **20**(2): p. 142-148.
11. Joseph Spurk H. , N.A., ed. *Strömungslehre*. 2010, Springer: Berlin.
12. Magde, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization*. Biopolymers, 1974. **13**: p. 29-61.
13. Elson, E.L. and D. Magde, *Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory*. Biopolymers, 1974. **13**: p. 1-27.
14. Magde, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy*. Physical Review Letters, 1972. **29**: p. 705-708.
15. Gosch, M., et al., *Hydrodynamic flow profiling in microchannel structures by single molecule fluorescence correlation spectroscopy III*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(14): p. 3260-3265.
16. Magde, D., W.W. Webb, and E.L. Elson, *Fluorescence correlation spectroscopy 3. Uniform translation and laminar-flow*. Biopolymers, 1978. **17**(2): p. 361-376.
17. Widengren, J., Ü. Mets, and R. Rigler, *Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**: p. 13368-13379.
18. Schwille, P., et al., *Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation*. Biophysical Journal, 1999. **77**(4): p. 2251-2265.
19. Widengren, J., *Fluorescence Correlation Spectroscopy, Photophysical Aspects And Applications*. 1996, Karolinska Institutet Stockholm.
20. Widengren, J., U. Mets, and R. Rigler, *Fluorescence correlation spectroscopy of triplet-states in solution*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(36): p. 13368-13379.
21. Koppel, D.E., *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy*. Physical Review A, 1974. **10**(6): p. 1938-1945.
22. Kühnemuth, R. and C.A.M. Seidel, *Principles of Single Molecule Multiparameter Fluorescence Spectroscopy*. Single Molecules, 2001. **2**(4): p. 251-254.
23. Gendron, P.O., F. Avaltroni, and K.J. Wilkinson, *Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient-Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Journal of Fluorescence, 2008. **18**(6): p. 1093-1101.
24. Rigler, R., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. European Biophysics Journal, 1993. **22**: p. 169-175.
25. Keller, R.A., et al., *Single molecule fluorescence analysis in solution*. Applied Spectroscopy, 1996. **50**(7): p. A12-A32.

26. Tellinghuisen, J., et al., *Analysis of fluorescence lifetime data for single rhodaminemolecules in flowing sample streams*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(1): p. 64-72.
27. Fries, J.R., et al., *Quantitative identification of different single-molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A, 1998. **102**: p. 6601-6613.
28. Rothwell, P.J., et al., *Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase: primer/template complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(4): p. 1655-1660.
29. Felekyan, S., et al., *Filtered FCS: Species Auto- and Cross-Correlation Functions Highlight Binding and Dynamics in Biomolecules*. ChemPhysChem, 2012. **13**(4): p. 1036-1053.
30. Eggeling, C., *Analyse von photochemischer Kinetik und Moleküldynamik durch mehrdimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie*. 1999, Georg-August-Universität Göttingen.
31. McCann, J.J., et al., *Supertertiary structure of the synaptic MAGuK scaffold proteins is conserved*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(39): p. 15775-80.
32. Enderlein, J., et al., *The statistics of single molecule detection: an overview*. Bioimaging, 1997. **5**: p. 88-98.
33. Ko, D.S., et al., *Determination of the diffusion coefficient of dye in solution at single molecule level*. Chemical Physics Letters, 1997. **269**: p. 54-58.
34. Eigen, M. and R. Rigler, *Sorting single-molecules- application to diagnostics and evolutionary biotechnology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(13): p. 5740-5747.
35. Arbour, T.J. and J. Enderlein, *Application of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy to microfluidic flow-velocity measurement*. Lab on a Chip, 2010. **10**(10): p. 1286-1292.
36. Dittrich, P.S. and P. Schwille, *Spatial two-photon fluorescence cross-correlation Spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(17): p. 4472-4479.
37. Lee, C.H., K. Jiang, and G.J. Davies, *Sidewall roughness characterization and comparison between silicon and SU-8 microcomponents*. Materials Characterization, 2007. **58**(7): p. 603-609.
38. Edel, J.B. and A.J. de Mello, *Single particle confocal fluorescence spectroscopy in microchannels: Dependence of burst width and burst area distributions on particle size and flow rate*. Analytical Sciences, 2003. **19**(7): p. 1065-1069.
39. Tellinghuisen, J., et al., *Analysis of Fluorescence Lifetime Data for Single Rhodamine Molecules in Flowing Sample Streams*. Analytical Chemistry, 1994. **66**: p. 64-72.
40. Pfiffi, D., *Steigerung der Signalstärke und der Photostabilität von Fluorophoren in der Einzelmolekülspektroskopie in PC II*. 2010, HHU: Düsseldorf.
41. Gregor, I., D. Patra, and J. Enderlein, *Optical saturation in fluorescence correlation spectroscopy under continuous-wave and pulsed excitation*. ChemPhysChem, 2005. **6**(1): p. 164-170.
42. Dertinger, T., et al., *Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: A new tool for accurate and absolute diffusion measurements*. ChemPhysChem, 2007. **8**(3): p. 433-443.

Tuning microfluidic mixers for ultrasensitive kinetic measurements using FCS and numerical methods (Supporting Information)

Denis Doerr¹, Shawn H. Pfeil², Everett A. Lipman³, Deborah Sandrin¹, Claus A. M. Seidel¹, Ralf Kühnemuth¹

¹Institute of Physical Chemistry II, Heinrich-Heine-University, Duessldorf, Germany.

²Department of Physics, University of California, Santa Barbara, California 93106, USA

³Penn Muscle Institute Philadelphia, Pennsylvania, United States

S1. Selection of single molecule event under high power conditions

In order to achieve higher F_{cpm} we performed measurements under high excitation power conditions with an excitation power density of $\langle I \rangle = 170 \text{ kW/cm}^2$ on rhodamine 123 in phosphate buffer (20 mM pH= 7) where 400 μ M concentration of dark state quencher AAZBC was added. Due to higher excitation power together with quenching of triplet and radical states by AAZBC the F_{cpm} was increased to 600 kHz, instead of 130 kHz in low power experiments without AAZBC. (Note: because the mean fluorescence countrate in the burst is dependent on threshold values Δt_{th} and n_{th} , we use F_{cpm} , which is estimated by FCS measurements (equation 12 main text redox paper) as objective parameter to describe changes of mean single molecule fluorescence signal in our single molecule experiments.) The background signal in high power experiments was increased to 350 kHz mainly due to fluorescence from AAZBC compound, which reduced the mean single molecule fluorescence countrate to background signal ratio (F_{cpm}/B) from 50/1 to 1.7/1. The decay time of background signal was below the resolution of our detectors (with IRF half width of 400 ps). Hence applying pulsed excitation it is possible to use micro time τ , which is defined as the time between detected photon and laser puls, to increase F_{cpm}/B for high power measurementns with AAZBC. By using TAC-channel gating it was possible to to reduce the background signal by 92 % (to 28 kHz) At the same time the fluorescence signal of rh 123 was reduced by only 25% (to 450 kHz) Thus the TAC-gating improved F_{cpm}/B for high power expirements with AAZBC to 16/1 (see Figure S1)

Note the TAC-gating is applied only to estimate the edges of each burst, hence the selected bursts still contain the complete signal including background photons. To estimate the number of fluorescence photons and background photons in each burst a mono-exponential model was fit to photon arrival time histograms of each selected burst (for a description of the fit algorithm see chapter S2).

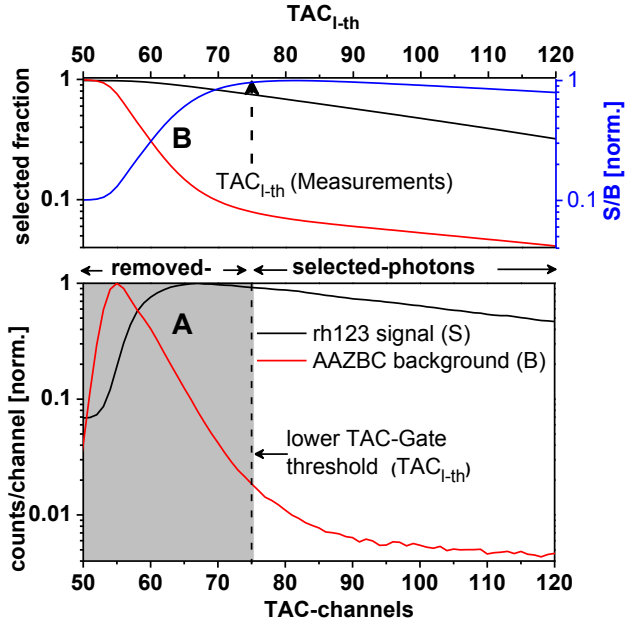


Figure S1 A, Fluorescence decay of rh123 (black line) and AAZBC (red line) in TAC-window, where each channel is 0.0651 ns. The grey box highlights the part of decay which is excluded by TAC-gating where the lower and higher thresholds are set to $TAC_{l-th} = 75$ channels and $TAC_{h-th} = 256$ channels respectively. B, Fraction of photons which remains after TAC-gating plotted against lower TAC-Gate threshold for. The blue line demonstrates signal/background ratio plotted against TAC_{l-th} . The dashed arrow points on the actual threshold value of $TAC_{l-th} = 75$ channels, which is used for single molecule measurements with AAZBC.

S2. Maximum likelihood estimator for fluorescence lifetime determination from single-burst data based on a model with mono-exponential decay

Photon arrival time histograms for parallel and perpendicular channels were constructed from single-burst data and analyzed according to a model function assuming a mono-exponential fluorescence decay time, τ_0 , a single rotational correlation time, ρ , and a high N.A. objective (mixing of polarizations [1]):

$$F_p(t) = \frac{1}{3} F_0 e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 + (2 - 3l_1) r_0 e^{-\frac{t}{\rho}} \right)$$

$$F_s(t) = \frac{1}{3} F_0 e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 - (1 - 3l_2) r_0 e^{-\frac{t}{\rho}} \right)$$

1

$F_p(t)$ and $F_s(t)$ are the fluorescence signals in the respective polarized detection channels as function of the photon arrival time, t , after the laser pulse. l_1 and l_2 are correction factors taking into account mixing of the polarized signals in the high numerical aperture objective. F_0 is the total initial fluorescence amplitude, r_0 the fundamental anisotropy.

With the Perrin equation $r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}} \Rightarrow \rho = \frac{\tau}{\frac{r_0}{r} - 1}$ follows:

$$F_p(t) = \frac{1}{3} F_0 e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 + (2 - 3l_1) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right)$$

$$F_s(t) = \frac{1}{3} F_0 e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 - (1 - 3l_2) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right) \quad 2$$

with the steady state anisotropy $r = \frac{G \cdot F_p^{\text{exp}} - F_s^{\text{exp}}}{(1 - 3l_1)G \cdot F_p^{\text{exp}} + (2 - 3l_2)F_s^{\text{exp}}}$ being calculated from the integrated experimental signal $S_{p,s}^{\text{exp}}$ per channel ($F_{p,s}^{\text{exp}} = (1 - \gamma)S_{p,s}^{\text{exp}}$. γ is obtained iteratively, see below).

The model decays for the two channels are convoluted with their respective instrumental response function *IRF*:

$$F_p(t) = \frac{1}{3} F_0 \left\{ \text{IRF}_p \otimes \left[e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 + (2 - 3l_1) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right) \right] \right\}$$

$$F_s(t) = \frac{1}{3} F_0 \left\{ \text{IRF}_s \otimes \left[e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 - (1 - 3l_2) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right) \right] \right\} \quad 3$$

The sum signal $F(t) = F_p(t) + 2G \cdot F_s(t)$ plus fraction γ of scatter background $B(t)$ simulates the total signal $S_{\text{tot}}(t)$. The factor $G = g_s/g_p$ compensates for different detection efficiencies g_s and g_p in the perpendicular and parallel detection channel, respectively.

$$S_{\text{tot}}(t) = A \left\{ (1 - \gamma) \frac{\text{IRF}_p \otimes \left[e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 + (2 - 3l_1) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right) \right] + 2G \cdot \text{IRF}_s \otimes \left[e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 - (1 - 3l_2) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right) \right]}{\int_{t=0}^{\infty} \left(\text{IRF}_p \otimes \left[e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 + (2 - 3l_1) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right) \right] + \text{IRF}_s \otimes \left[e^{-\frac{t}{\tau_0}} \left(1 - (1 - 3l_2) r_0 e^{-\frac{t}{\tau_0} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)} \right) \right] \right) dt} + C \right\} \quad 4$$

$$C = \gamma \frac{B_p(t) + 2B_s(t)}{\int_{t=0}^{\infty} (B_p(t) + B_s(t)) dt} \quad 4a$$

$S_{\text{tot}}(t)$ is fit to the experimental data $S_{\text{tot}}^{\text{exp}}(t) = S_p^{\text{exp}}(t) + 2S_s^{\text{exp}}(t)$ applying a maximum likelihood estimator (MLE) by minimizing $2I^*$. The factor A normalizes the model function to the measured data. Repetitive

excitation is taken into account [2]. The fixed parameters in the fits were as follows: $r_0 = 0.38$, $l_1 = 0.0308$ and $l_2 = 0.0368$.

S3.Flow setup for single molecule measurements

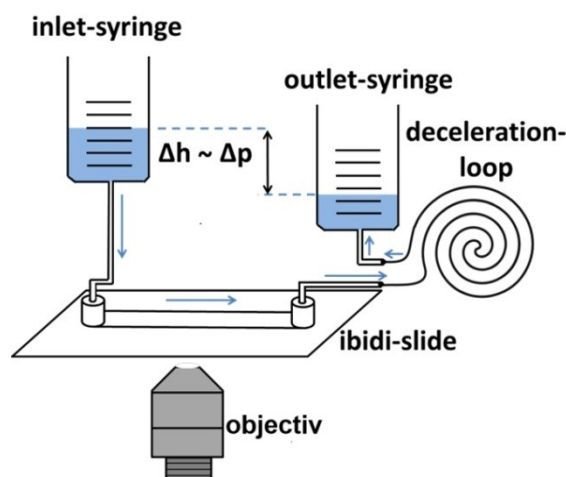


Figure S2 Setup which generates flow for single molecule measurements, where the pressure difference which is proportional to the height difference between inlet and outlet is used as driving force for flow velocity. FCS was used to estimate the actual flow velocity for each measurement.

In order to simplify single molecule experiments we used a commercially available flow chamber (*sticky-Slide I Luer*, ibidi) with channel height, length and width of 0.1 mm, 5 mm and 48 mm respectively, instead of a microfluidic mixer. As driving force for the flow in the chamber the fluid level difference between syringes connected to outlet and inlet of the flow chamber was used (Figure S2). The approximate precision by setting the height difference was about 1 mm (which corresponds to pressure of $\Delta p = 9.8$ Pa). The corresponding error of flow velocity would be too big (about 0.2 $\mu\text{m}/\text{ms}$) if only ibidi-slides with relatively small hydro dynamical channel impedance ($R_h = 0.117$ kPa·s/nL) were used for the flow setup. Adding an additional deceleration loop to the flow setup (a tube with the length of 0.55 m and inside radius of 220 μm (corresponding $R_h = 0.6$ kPa·s/nL)) allows to adjust the appropriate flow velocities in the range of 0.5-3 $\mu\text{m}/\text{ms}$ with a precision of 0.03 $\mu\text{m}/\text{ms}$ using the easily controllable height difference of 1-10 cm.

S4. Fluorescence burst selection

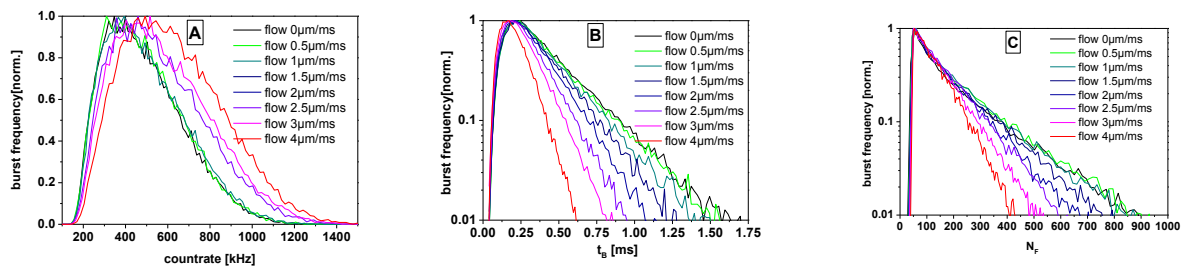


Figure S3 Distribution of burst count rate (A), burst duration (B) and fluorescence photons in bursts (C) for simulated data, where the same settings are used to select the fluorescence bursts for different flows ($\Delta t_{th}=0.0075\text{ms}$, $n_{th}=50$ photons, $m=10$ photons, see main text). The number of fluorescence photons in the bursts (N_F) is calculated using the fraction of scatter γ (see chapter 0), where $N_F=n_B-(n_B\cdot\gamma)$ and n_B is a total number of photons in the selected bursts.

In single molecule measurements only a minor fraction of well-defined (big) bursts is selected by the burst selection algorithm. Hence for comparison of burst sizes which are taken under different conditions it is necessary to assure selection of the appropriate fraction of bursts under each condition. Figure S3 shows the selected burst data for Brownian dynamics simulation with the same selection parameter for different flow velocities.

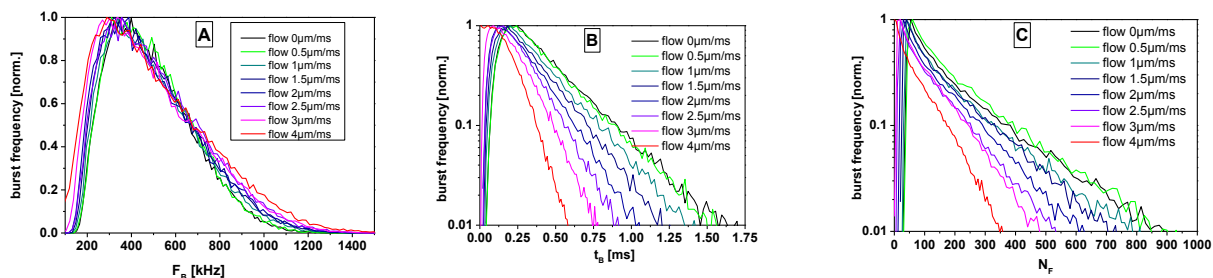


Figure S4 Distribution of burst count rate (A), burst duration (B) and fluorescence photons in bursts (C) for simulated data, where the settings for the fluorescence burst selection procedure are adapted (see Table S1) to keep the average count rate in the burst constant ($\langle F_B \rangle = 495\text{kHz}$).

The shift of the burst count rate distributions to higher count rates indicates selecting different fraction of bursts with different flows. However comparison of mean burst duration in selections where the threshold values are adopted to keep the count rate constant with mean burst duration in selections where the same threshold values are used for different flow velocities gains similar burst duration distributions (see Figure S4 and Figure S5)

Table S1 Selection parameter for fluorescence burst data shown in Figure S4. The averaging window for all data was set to $m=10$ photons

Flow velocity [$\mu\text{m/ms}$]	Δt_{th} [ms]	n_{th} [photons]
0	0.0075	50
0.5	0.0075	50
1	0.0075	40
1.5	0.0075	33
2	0.0075	25
2.5	0.0075	18
3	0.0075	8
4	0.0075	---

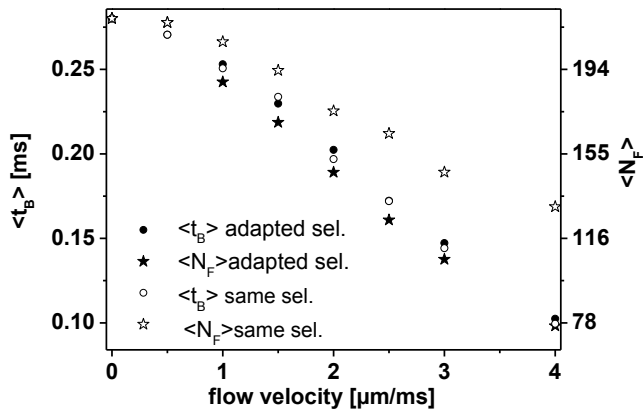


Figure S5 Mean burst duration $\langle t_B \rangle$ (dots) and mean fluorescence photon number in burst $\langle N_F \rangle$ (stars) plotted against corresponding flow velocities for Brownian dynamics simulations. Where empty symbols represent data with the same burst selection parameter (Figure S3) and filled symbols represent data with adapted burst selection parameters (Figure S3 Table S1)

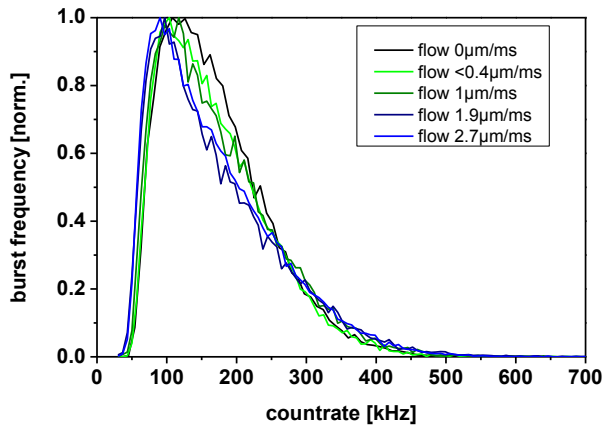


Figure S6 Distributions of burst countrates in single molecule measurements with different flow velocities where the burst selection parameters are adapted (Table S2) to keep the mean burst countrate constant.

Table S2 Selection parameter for fluorescence burst data with low power density ($\langle I \rangle = 24 \text{ kW/cm}^2$), shown in Figure S6. The averaging window for all data was set to $m=12$ photons.

Flow velocity [$\mu\text{m/ms}$]	Δt_{th} [ms]	n_{th} [photons]
0	0.020	20
<0.4	0.020	20
1	0.020	17
1.9	0.020	10
2.7	0.020	3

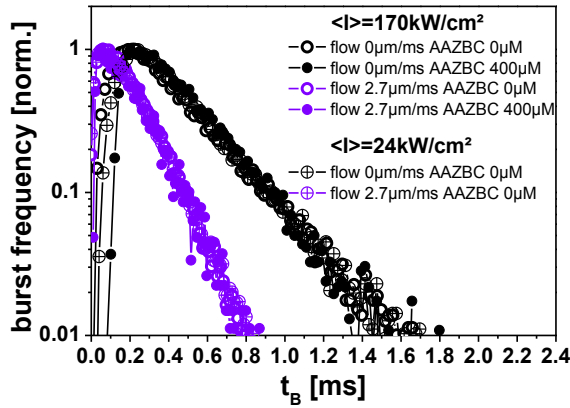


Figure S7 B: $t_B D$ for measurements with excitation power $\langle I \rangle = 24 \text{ kW/cm}^2$ in comparison to $t_B D$ for measurements with $\langle I \rangle = 170 \text{ kW/cm}^2$ and with $400 \mu\text{M}$ AAZBC

Table S3 Selection parameter for fluorescence burst data with high power density ($\langle I \rangle = 170 \text{ kW/cm}^2$) shown in Figure S7. The averaging window for all data was set to $m=25$ photons.

	Δt_{th} [ms]	n_{th} [photons]	n_+
AAZB $400 \mu\text{M}$ flow $0 \mu\text{m/ms}$	0.004	50	50
AAZB $400 \mu\text{M}$ flow $2.7 \mu\text{m/ms}$	0.006	30	0

- (1) Koshioka, M.; Sasaki, K.; Masuhara, H. *Appl Spectrosc* **1995**, *49*, 224.
- (2) Brand, L.; Eggeling, C.; Zander, C.; Drexhage, K. H.; Seidel, C. A. M. *J Phys Chem A* **1997**, *101*, 4313.
- (3) Koppel, D. E. *Phys Rev A* **1974**, *10*, 1938.

Fluorophors as Optical Sensors for Local Forces

Stefan Marawske, Denis Dörr, Daniel Schmitz, Axel Koslowski, You Lu, Helmut Ritter*, Walter Thiel*, Claus A.M. Seidel*, Ralf Kühnemuth*

The main aim of this study is to investigate correlations between the impact of an external mechanical force on the molecular framework of fluorophores and the resultant changes of their fluorescence properties. Taking into account previous theoretical studies we designed a suitable custom-tailored oligoparaphenylenevinylene (OPV) derivative with a twisted molecular backbone. Thin foils made of PVC doped with 100 nM OPV have been prepared. By applying uniaxial force the foils were stretched. Three major optical effects were observed simultaneously. First, the fluorescence anisotropy increased, which indicates a reorientation of the fluorophores within the matrix. Second, the fluorescence lifetime decreased by approximately 2.5 % (25 ps). Finally we observed an increase of the emission energy of about 0.2% (corresponding to a blue-shift of 1.2 nm). In addition, analogous measurements with Rhodamine 123 as an inert reference dye showed

only minor effects which can be attributed to matrix effects due to refractive index changes. To relate the observed spectroscopic changes to the underlying changes in molecular properties, quantum-chemical calculations were also performed. Semiempirical methods had to be used because of the size of the OPV5 chromophore. Two conformers of OPV5 (C_2 and C_i symmetry) were considered which both gave very similar results. Both the observed blue-shift of fluorescence and the reduced lifetime of OPV5 under tensile stress are consistent with the results of the semiempirical calculations. Our study proves the feasibility of fluorescence-based local force probes for polymers under tension. Improved optical sensors of this type should in principle be able to monitor local mechanical stress in transparent samples down to the single molecule level, which harbors promising applications in polymer and nano science and technology.

1. Introduction

Synthetic polymers are increasingly used in mechanically demanding applications. These products show residual stresses which can lead to deformation, fracture or even complete breakage of the material if exposed to e.g. strong variations of temperature or effective mechanical forces. Therefore, a detailed understanding of these residual stresses is essential for quality assessment and further development and improvement of polymers. To test the material properties local probing can be achieved by doping with fluorophores that are sensitive to the environment and forces. Several studies are already available that describe optical properties of low-molecular fluorophores physically mixed with polymeric matrices. Observed effects like spectral shifts have been related to mechanical manipulation in case of simple distance sensors based on force-induced excimer formation and dissociation^[1] or charge-transfer probes^[2]. Fluorescence lifetime changes have been proposed to monitor local stress in polymer films^[3]. Dissolved dyes have been used to probe orientation and alignment of polymer matrices^[4]. Specific mechanical manipulation of optically induced cis-trans transitions in polyazobenzenes with DMSO as solvent has been demonstrated on the single molecule level^[5].

According to simulations it is expected that conjugation in distorted or twisted fluorophores, with sterically hindered ground states, can be improved by applying an external unidirectional force^[6]. One class of these fluorophores consists of oligoparaphenylenevinylene derivatives (OPVs)^[6, 7]. OPVs have been investigated extensively as they are model systems for the corresponding polymers (polyparaphenylenevinylene, PPV)^[8], which are of great technological interest for applications in optoelectronic devices like organic light-emitting diodes.

Optical properties of PPVs^[9, 10] and OPVs^[11] are partially governed by the conjugation length of the individual chromophoric unit that is a result of its local chemical environment and

[*] D. Dörr,^[+] S. Marawske,^[+] Dr. R. Kühnemuth, Prof. Dr. C.A.M. Seidel
Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstr. 1, D 40225 Düsseldorf
Fax: (+) 49 (0)211 81 12803
E-mail: ralf.kuehnemuth@uni-duesseldorf.de
E-mail: c.seidel@gwdg.de

D. Schmitz, Prof. Dr. H. Ritter
Lehrstuhl für Präparative Polymerchemie
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstr. 1, D 40225 Düsseldorf
Fax: (+) 49 (0)211 81 15840
E-mail: h.ritter@uni-duesseldorf.de

Dr. A. Koslowski, Y. Lu, Prof. Dr. W. Thiel
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1
D 45470 Mülheim an der Ruhr
Fax: (+) 49 (0)208 306 2996
E-mail: thiel@mpi-muelheim.mpg.de

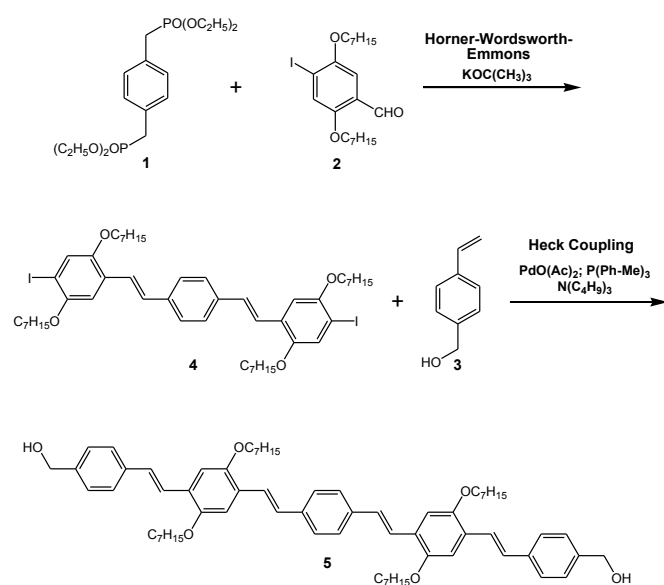
[+] These authors contributed equally to this work.

deformation. The effect of relative molecular alignment in aggregates and oriented thin films on intermolecular coupling and energy transfer as prominent optical processes in the condensed phases of these chromophores has been studied in detail^[11, 12]. However, in order to avoid fluorophore interactions we reduced the probe concentration to levels approaching the single-molecule regime. Moreover, none of the previous spectroscopic studies could present a complete characterization of the optical properties of a fluorescent probe including lifetime, anisotropy and spectral shifts as a function of the tensile stress in conjunction with a detailed theoretical analysis. The quantitative correlation of these techniques is a prerequisite to understand the underlying fundamental processes and to optimize specialized fluorophores. In this study we designed a custom-tailored endgroup-functionalized OPV as model compound which, based on the available information provided in the earlier reports^[1-4, 6, 7, 11], is expected to show a significant change in the fluorescence properties if an external force is applied.

2. Results and Discussion

2.1 Synthesis

An OPV-type fluorophore **5** (OPV5) with sterically demanding n-heptyloxy side-chains and hydroxyl end-groups was synthesized in a stepwise procedure shown in Scheme 1.



Scheme 1. Synthesis of the 5-ring oligo(paraphenylenevinylene) OPV5 diol

In a first step the double Horner-Wadsworth-Emmons reaction of p-xylylen-bis(diethyl)phosphonate **1** and 4-formyl-1-iodo-2,5-bis(heptyloxy)-benzene **2** gave the styrylstilbene derivative **4**, which was subsequently reacted with 4-vinylbenzyl alcohol **3** in terms of a Heck reaction to form the wanted OPV5 diol **5**.^[14-18]

2.2 Fluorescence properties of OPV5

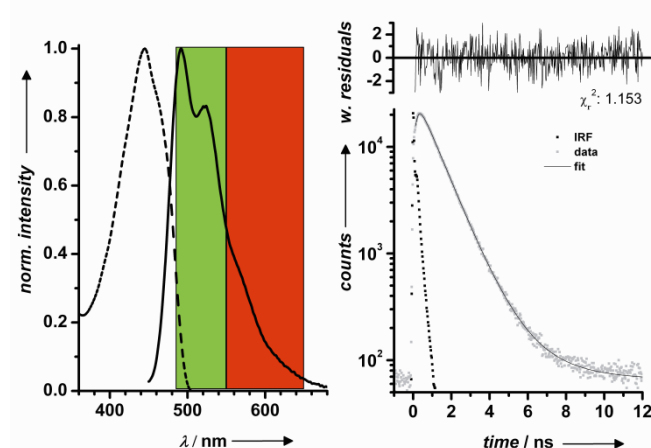


Figure 1. OPV5 in PVC: left: absorption (dashed) and fluorescence (solid) spectra with detection windows for green (478-555 nm) and red (555-645 nm); right: decay histogram with double-exponential fit and residuals of OPV5 $F(t) = IRF \otimes [A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2)] + B$; where IRF is the instrumental response function, A_i is the fraction of the particular lifetime component τ_i and B is the background (results listed in Table 1).

The fluorescence properties of OPV5 were investigated by measuring steady state absorption and emission spectra, anisotropy, fluorescence lifetime, and quantum yield in THF (Table 1). The normalized absorption and fluorescence spectra and a typical result for the fluorescence decay of OPV5 dissolved in PVC are shown in Figure 1. To recover the fluorescence lifetimes from the data by nonlinear regression analysis, the background contribution was determined from the baseline before the laser pulse and a double-exponential decay model was applied, taking into account repetitive excitation^[19]. Double and triple exponential decays of OPVs have been described in literature before, the origin of the two longer lifetimes having been assigned to cis-trans isomers. A very fast component of 20-50 ps was related to excited state dynamics of the chromophore^[20]. Within the time resolution of our bulk setup we also observe a double exponential fluorescence decay with two significant components in THF (see Table 1).

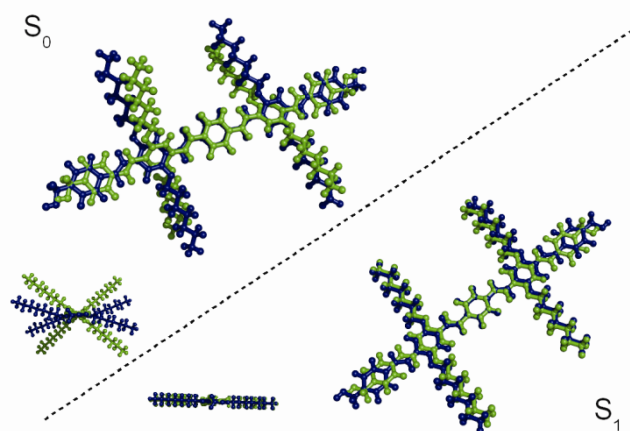
Table 1. Spectral properties of OPV5 in different environments						
OPV in	$\lambda_{EX}[\text{nm}]^{\text{a}}$	$\lambda_F[\text{nm}]^{\text{b}}$	$\tau_1[\text{ns}]^{\text{c}}$	$\tau_2[\text{ns}]^{\text{c}}$	$\tau_{av}[\text{ns}]^{\text{d}}$	Φ_F^{e}
THF	432	485	0.83 (0.77)	0.52 (0.23)	0.78	0.53
PVC	445	492	0.97 (0.97)	^[f]	1.03	0.81

[a] Absorption maximum. [b] Fluorescence maximum. [c] Fluorescence lifetime components, τ_i (amplitudes, A_i). [d] Fluorescence weighted average lifetime $\tau_{av} = (A_1 \cdot \tau_1^2 + A_2 \cdot \tau_2^2) / (A_1 \cdot \tau_1 + A_2 \cdot \tau_2)$. [e] Fluorescence quantum yields, measured in THF and extrapolated by correcting for refractive index in case of PVC (for details see supporting information section 2). [f] Typically a minor component of ~2.2 ns was observed, probably due to background fluorescence of the polymer matrix or distorted OPVs. Lifetimes in PVC were determined from p-polarized fluorescence in the green spectral window to maximize signal-to-noise ratio.

However, in a PVC foil the fluorescence decay shows a single dominant lifetime component (97%) of 0.97 ns. The decay contains also a minor (3-5%) contribution of a longer second fluorescence lifetime of 2.2 ns, which may be attributed to background fluorescence of the polymer matrix or distorted OPVs. Moreover, OPV5 in the foil is brighter than in THF as indicated by an increase of the fluorescence lifetime and quantum yield (Table 1). As the number of photons in our experiment was limited due to photobleaching, the two different lifetime components were difficult to separate. Therefore, the fluorescence weighted average lifetime (Table 1) of OPV5 was found to be a stable parameter for further fluorescence lifetime analysis. Typical spectral properties of OPV5 in different environments are listed in Table 1.

2.3 Quantum-chemical calculations

To relate the observed spectroscopic changes to the underlying changes in the molecular properties, quantum-chemical calculations were performed using semiempirical methods because of the size of the OPV5 chromophore. The theoretical study involved the selection of a suitable semiempirical approach (AM1) through comparison with higher-level results for small model compounds, computation of ground-state potential curves (AM1/SCF) for elongation of the chromophore, reoptimization of the resulting geometries in the first excited singlet state, and calculation of its spectral properties using multireference configuration interaction (AM1/MRCI) methods (for details see supporting information section 3).



Scheme 2. Simulation of the conformational change in the molecular geometry of OPV5 under C_2 symmetry in the ground state (left) and in the first excited state (right), green: no force applied, blue: 6.9 nN per molecule.

Two conformers of OPV5 (C_2 and C_i symmetry, were considered which both gave very similar results as shown in Figure 2. Scheme 2 shows the C_2 geometries of the ground and the first excited state without (green) and with applied force (blue). The distance of the outermost ring carbon atoms of the chromophore was varied and all other coordinates of the molecule were then allowed to relax. Forces were computed by analytical differentiation of a cubic-spline fit of the computed potential curves. No breakage of any chemical bond was observed even at the highest applied force (6.9 nN). This is consistent with reported rupture forces for C-C single bonds in the range of 2.3 to 13.4 nN^[21] taking into account the higher stability of OPV5 due to

the partial double bond character of its molecular backbone. In the ground state (Scheme 2, left) an unwinding of the molecular backbone under stress is observed, whereas the first excited singlet state S_1 (Scheme 2, right) remains almost planar throughout. For the range of forces considered (up to 6.9 nN), the AM1/MRCI calculations give a notable increase in the fluorescence energies (wavenumber $\tilde{\nu}$ in cm^{-1}) upon stretching as shown by the black curve in Figure 2, and also an initial increase in the oscillator strengths f (for forces up to 4 nN). The resulting fluorescence lifetimes^[22] $\tau_r = 3/(2f\tilde{\nu}^2)$ as derived from the Einstein coefficients decrease monotonically (up to 16% for the maximum force of 6.9 nN) which is indicated by the green curve in Figure 2. The calculations thus predict a blue-shift of fluorescence and reduced radiative lifetimes upon stretching OPV5 (see also Figure 2) along the conjugated chain.

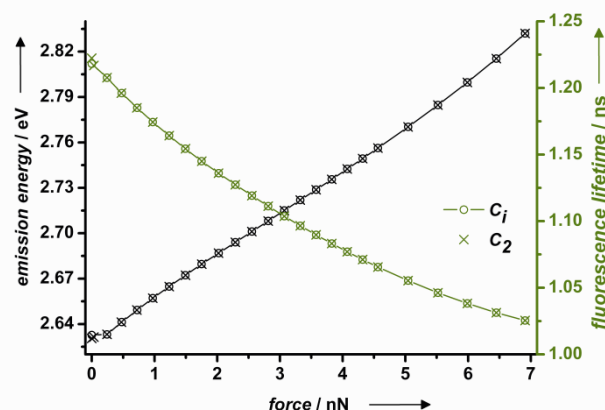


Figure 2. Calculated emission energies (black) and fluorescence lifetimes (green) dependent on the applied force per molecule. Results are shown for two different conformers, one in C_2 symmetry (crosses) and one in C_i symmetry (circles) with nearly identical results super-imposed on top of each other.

2.4 Combined force and fluorescence experiments

In order to investigate the impact of force on the fluorophores, thin foils (~50 μm) made of technical atactic PVC doped with OPV5 (ca. 100 nM) have been prepared. By applying uniaxial force the foil is stretched. As the foil is comparatively thin and the concentration of the dye is low, reabsorption is negligible in our experiments. In order to minimize surface effects great care was taken to keep the laser focus centered in the PVC foil throughout the whole experiment. In this way the observation volume was at least 20 μm away from any surface. At each data point of the fluorescence analysis a xy-scan using a piezo-scanner was performed in order to minimize photobleaching and to be more independent on local heterogeneities of the foil which might occur in the preparation process.

Three major optical effects can be observed simultaneously (Figure 3). First, the fluorescence anisotropy increases (top panel), which indicates a reorientation of the fluorophores within the matrix. Second, the fluorescence lifetime decreases (middle panel) by approximately 2.5% ($\Delta\tau = -25 \pm 2.5$ ps). Finally we observe a blue shift in the emission spectrum by about 1.2 nm (bottom panel), as indicated by an increased background-corrected signal intensity ratio, F_G/F_R , in the green and red spectral detection windows (Figure 1, left). In the next sections we will discuss all three effects in detail. As a negative control

measurement we also prepared foils doped with Rhodamine 123 (Rh123) under the same conditions as mentioned. The Rh123 is a rather spherical dye with no pronounced long axis, as in case of OPV5. Moreover Rh123 has a rigid molecular backbone, so that it is expected to be quite insensitive to external forces.

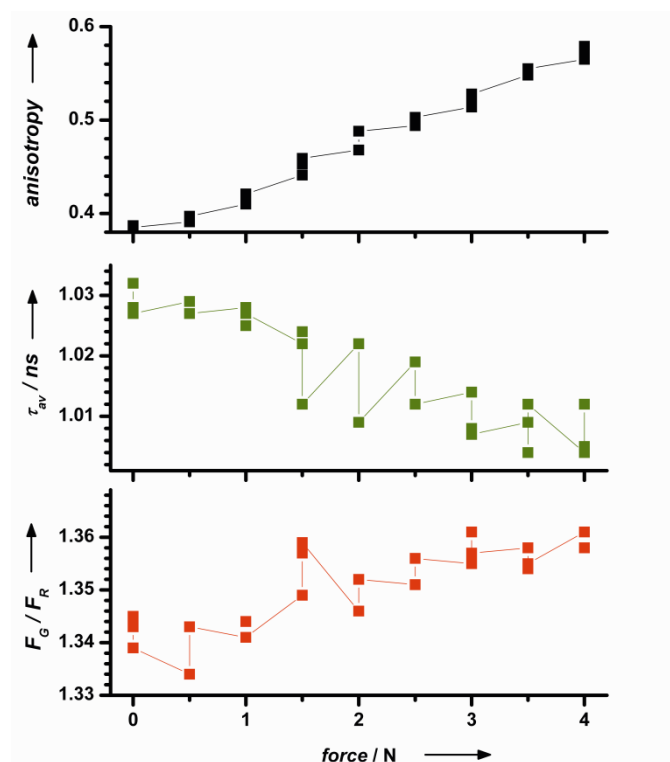


Figure 3. Increasing fluorescence anisotropy (top panel, black), decreasing fluorescence lifetime (middle panel, green) and increasing green to red signal ratio (bottom panel, red) of OPV5 within the PVC foil versus the applied force.

2.4.1 Fluorescence anisotropy

In the force experiment the polarization of the exciting laser light and the pulling direction were chosen to be parallel to maximize excitation probability. As the transition dipole moments of OPVs are oriented almost parallel to their molecular backbones^[13, 23], the increase in fluorescence intensity as well as in anisotropy while the foil is stretched shows that the fluorophores change the orientation of their long axis towards the direction of tension. This fluorescence increase and the irreversibility of this effect prove that the molecular rotation of OPV5 in PVC is negligible, making it an ideal marker to probe local orientations of suitable polymer matrices. This is in accordance with stretch orientation studies of different OPV derivatives dissolved in polyethylene or polystyrene foils^[24]. For a quantitative evaluation of the experiments it is necessary to take the individual sample cross-sections S_i (S = thickness $\times$ width) of the foil for each point of the measurement into account by calculating the applied mean tensile stresses F_i/S_i (F_i being the applied force, S_S and S_E the cross sections at start and end of the experiment and $(\Delta L_i)/(L_E - L_S)$ the relative elongation). Figure 4a illustrates the strict correlation between the elongation of the foil (open triangles) and the change of the fluorescence anisotropy (full triangles) dependant on the mean tensile stress. Orientation of the polymer matrix was also confirmed using a polarization microscope. The unstretched unstained foil does not show any preferred direction

whereas the stretched foil clearly exhibits birefringence as expected (not shown)^[25]. This indicates that the macroscopic pre-alignment of the polymer chains in the unstretched foils is negligible.

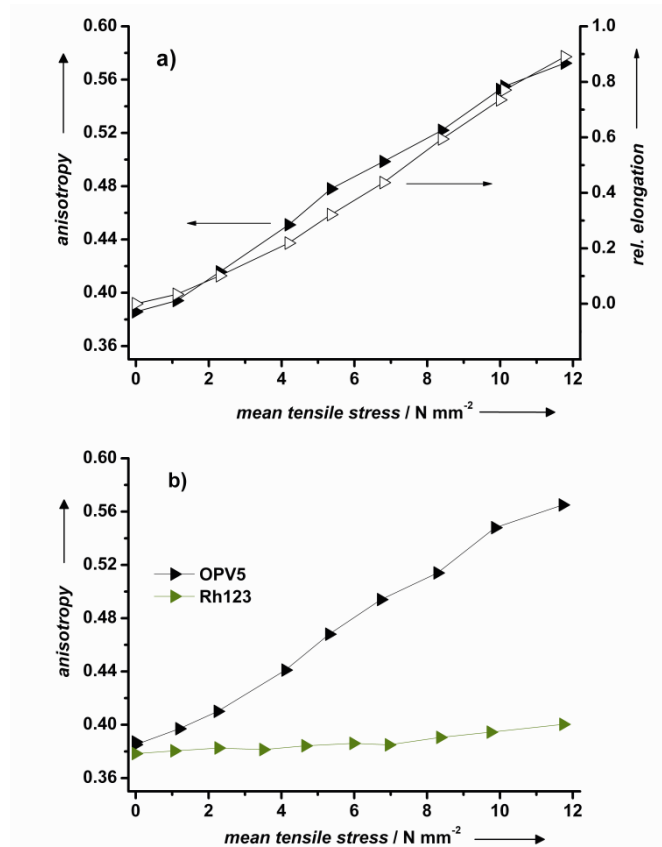


Figure 4a. Relative elongation of the PVC foil (open triangles) and the fluorescence anisotropy of OPV5 (full triangles) versus mean tensile stress. Figure 4b. Comparison of the anisotropy between OPV5 (black) and Rh123 (green). With increasing tensile stress the OPV5 fluorophore shows a distinct reorientation whereas in case of Rh123 the effect is remarkably smaller.

If we compare the change in anisotropy between OPV5 (black) and the control dye Rh123 (green) as shown in Figure 4b it is clearly visible that the anisotropy very sensitively reflects the reorientation of OPV5 whereas in case of Rh123 just the expected small change is observed.

2.4.2 Fluorescence lifetime

For the analysis of the fluorescence lifetime in our combined force and fluorescence experiments we exclusively used data recorded by an ultra-fast single-photon sensitive detector (Micro- Photon-Device(MPD), IRF ~ 30 ps, see also experimental section). The results of a detailed analysis of the fluorescence decay time of OPV5 as a function of the mean tensile stress is displayed in Figure 5a. The black curve shows the first part of the experiment (pulling) while the blue curve describes the second step (relaxation). With increasing stress the fluorescence lifetime is decreasing down to $\Delta\tau = 25 \pm 2.5$ ps at the highest applicable stress of 12 N mm^{-2} . The effect is not completely reversible upon relaxation: in the presented experiment the final lifetime at 0 N is lower than the initial value at 0 N by about 10 ps. In a second

extension relaxation cycle with the same sample the observed hysteresis was significantly smaller (not shown).

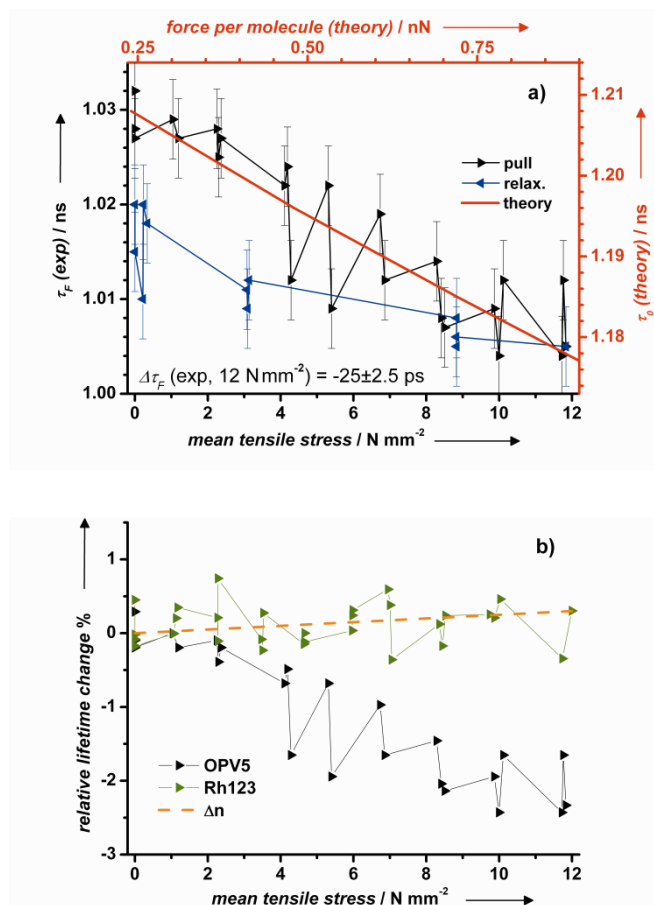


Figure 5a. Comparison between a typical fluorescence lifetime measurement (black axes) and theory (AM1/MRCI, red): The PVC foil was stretched (black) and subsequently relaxed (blue). The error-bars represent the shot-noise limited uncertainty of the lifetime fits of about 4 ps. Both ordinates are scaled to equal relative range of lifetimes. Figure 5b. Comparison of the relative fluorescence lifetime change between OPV5 (black) and Rh123 (green). Upon stress the fluorescence lifetime of the OPV5 fluorophore decreases up to 2.5% at a maximum tensile stress of around 12 N mm⁻² whereas Rh123 only shows a slight increase close to the noise level which is consistent with expected changes due to refractive index changes of the matrix (Δn , dashed orange).

We also performed measurements in which the fluorescence lifetime returned to the starting value within the first cycle, indicating slight variations in the local static interactions of fluorophore and matrix for different samples. With different samples we observed changes of the fluorescence lifetime between 20 and 45 ps (average effect is around -26 ± 5 ps for applied tensile stresses of 12 N mm⁻²). Foils with less plasticizer exhibited a similar, approximately linear dependence of lifetime on the tensile stress only after an offset of up to 10 N mm⁻² (supporting information section 2.5). An alignment is achieved much faster in soft and flexible samples. This indicates the necessity for at least partial molecular alignment to couple solutes with external forces. Rates of radiative transitions depend on the environment of the chromophore, in particular on the local index of refraction. Two independent effects can cause the refractive index of PVC to change upon stretching (for details see Table 2 and supporting information section 2.3): (1) From reported density changes^[26] the Lorentz-Lorenz equation^[27] predicts index

variations of the order of $\Delta n \approx 4.6 \cdot 10^{-4}$ for relative elongations of 100%. (2) The observed birefringence due to polymer chain orientation was reported to be around one order of magnitude stronger, ranging up to $\Delta n \approx 3.1 \cdot 10^{-3}$ [26, 28-32].

By applying a modified Strickler-Berg approach different cavity models have been developed which should be taken into account to estimate the influence of refractive index changes on the fluorescence lifetime^[33]. As the solvent is expelled from the volume occupied by the fluorescent molecule a cavity is created in which the fluorophore is located. In the approximation and depending on the guest molecules shape the empty spherical cavity model (ESC) or the empty ellipsoidal cavity model (EEC) can be used to describe the appropriate boundaries. The OPV5 fluorophore probably is described best by an ellipsoidal model. In case of Rh123 we believe that the empty spherical cavity model more realistically reflects the molecular shape. Corresponding changes of the fluorescence lifetime as estimated using these empty cavity models are expected to be smaller than ca. 3 ps which is a relative change of less than 0.5% (Table 2)^[33].

Table 2. Influence of the matrix due to refractive index changes on the fluorescence properties of OPV5 and Rh123. Effects on the fluorescence lifetime assumed by an empty spherical cavity model (ESC) and an empty ellipsoidal cavity model (EEC). Effects on solvatochromic shifts of the emission spectra by applying Onsager theory.

	Δn	$\Delta \tau_{\text{r}}^{\text{ESC}}$ [ps] ^[a]	$\Delta \tau_{\text{r}}^{\text{EEC}}$ [ps] ^[b]	$\Delta \tau_{\text{f}}^{\text{ESC}}$ [ps] ^[c]	$\Delta \tau_{\text{f}}^{\text{EEC}}$ [ps] ^[d]	$\Delta \lambda^{\text{[e]}}$ [nm]
OPV 5	r. index 4.6x10 ⁻⁴	-0.64 (0.05%)	-0.38 (0.03%)	-0.42 (0.04%)	-0.25 (0.02%)	0.022
	birefr. 3.1x10 ⁻³	-4.36 (0.34%)	-2.56 (0.20%)	-2.87 (0.28%)	-1.69 (0.16%)	0.146
	Exp.	-25 ± 2.5 (2.5%)				-1.2 ± 0.2
Rh 123	r. index 4.6x10 ⁻⁴	-1.59 (0.05%)	n.a.	-1.47 (0.05%)	n.a.	0.063
	birefr. 3.1x10 ⁻³	-10.71 (0.33%)	n.a.	-9.92 (0.32%)	n.a.	0.420
	Exp.	6 ± 10 (~0.3%)				0.4 ± 0.2

[a,b] change of radiative lifetime [c,d] change of fluorescence lifetime [e] solvatochromic shift.

This is almost an order of magnitude smaller than the lifetime effect we observe. To further characterize the static matrix effect, we also performed measurements with the rigid dye Rh123 dissolved in PVC. We could not observe any significant change in the fluorescence lifetime τ_{f} . At a fluorescence lifetime of about 3.1 ns we found a change of $\Delta \tau_{\text{f}} = 4 \pm 8$ ps at 12 N mm⁻². Within the statistical errors of around 8 ps the relative change is smaller than 0.3%, which nicely agrees with expected refractive index effects of up to 10 ps (Table 2). In Figure 5b the relative lifetime changes for OPV5 (black) and Rh123 (green) are shown. In case of Rh123 the changes can be attributed to the discussed refractive index changes alone as indicated by the dashed orange curve whereas the fluorescence lifetime of OPV5 shows a clear decrease up to 2.5%, about an order of magnitude larger than by Δn would be predicted (further details can be found in Table 2 and in the supporting information section 2.3). The fluorescence

lifetimes from the semiempirical AM1/MRCI calculations are also included in Figure 5a (red part of the graph). They show an almost linear dependence on the applied force, being consistent with the experimental observations. The absolute values of the fluorescence lifetimes differ between theory and experiment, partly because of refractive index effects and nonradiative processes ($\Phi_F < 1$) in the PVC matrix which were not taken into account in the simulations. Moreover, theory directly relates the force exerted on a single molecule to a change in radiative lifetime of S_1 whereas the only experimentally accessible information is the macroscopic mean tensile stress to which the whole foil is exposed. The force per molecule exerted in the foils can be estimated by using the mean molecular cross section of PVC molecules of about 0.3 nm^2 . It is around 4 pN per molecule for the maximum force in Figure 6a (see also supporting information section 2.2). This is only a mean value assuming a homogeneous force distribution in the substrate. Forces on individual molecules might locally be higher and can approach the realm where covalent chemical bonds may break (2.3 to 13.4 nN)^[21, 34]. Our measured values as indicated by comparison of theory and experiment are within these limits. Thus elongation induces a change of an apparent local mechanical force of ca. 0.6 nN per molecule (Figure 5a).

2.4.3 Spectral blue-shift of fluorescence

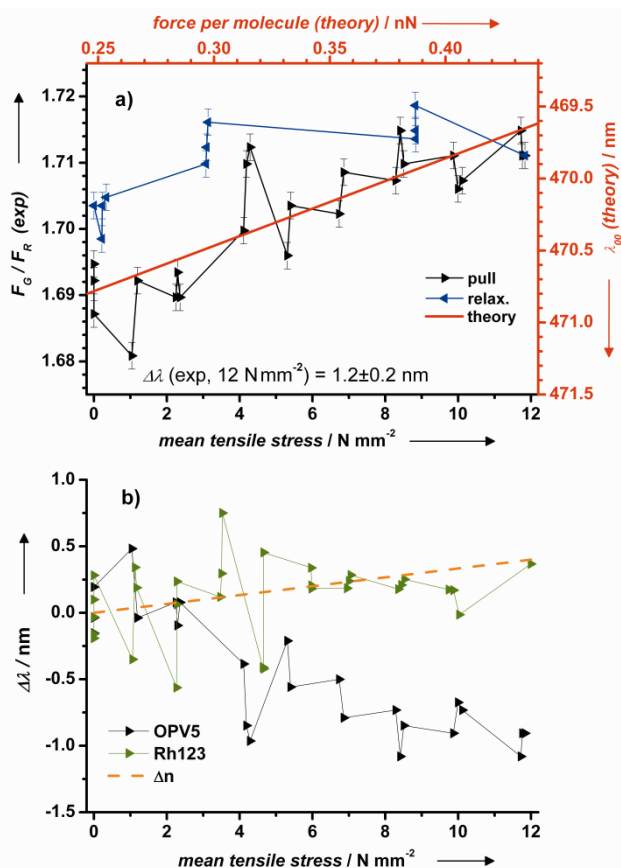


Figure 6a. Green to red fluorescence ratio F_G/F_R from the experiment (black axes) in Figure 5a versus mean tensile stress. The PVC foil was stretched (black) and subsequently relaxed (blue). Also shown is the calculated (AM1/MRCI, red) spectral shift as function of the force applied on a single molecule. Both ordinates are scaled to equal relative spectral range. The error bars represent shot-noise. The real error is larger probably due to chromatic aberrations caused by mismatch of refractive index of PVC foil ($n=1.53$) and objective design (corrected for $n=1.33$). The aberrations depend strongly on the focus position inside the foil and change upon stretching. Figure 6b.

Comparison of the relative spectral shift of OPV5 (black) and Rh123 (green). At the maximum tensile stress of around 12 N mm^{-2} the spectrum of OPV5 features a blue-shift of 1.2 nm whereas the spectrum of Rh123 reveals a small red-shift consistent with estimations of the influence of the matrix alone due to refractive index changes (dashed orange).

Simultaneously with the changes in anisotropy and lifetime there is a spectral shift of the fluorescence upon stretching which was detected by monitoring the intensity ratio of the two spectral bands in the emission region ("green" and "red", Figure 1, left). The results of this analysis are shown in Figure 6a. The black curve describes the results of the pulling step, in blue the subsequent relaxation step is shown and in red the results of the theoretical calculations are given. With increasing tensile stress the green to red fluorescence ratio F_G/F_R is increasing, indicating a blue shift of the spectra. Using the spectral shape as determined by steady state measurements of the unstrained foil the observed change in the ratio F_G/F_R for tensile stresses up to 12 N mm^{-2} translates into a blue shift of about $1.2 \pm 0.2 \text{ nm}$, as determined by linear regression analysis.

According to the AM1/MRCI calculations, this shift would be consistent with a change of an applied local mechanical force of ca. 0.18 nN per molecule. Using spectral positions given in Table 1 and applying Onsager theory^[35] we expect red-shifts in the force experiment due to refractive index changes smaller than $\Delta\lambda \approx 0.15 \text{ nm}$ in case of OPV5. Corresponding reference measurements with Rh123 showed a spectral red-shift of $\Delta\lambda = 0.31 \pm 0.14 \text{ nm}$ at 12 N mm^{-2} , which is within the expected range for refractive index induced changes of up to 0.4 nm for this dye. In Figure 6b the relative changes of the emission maxima are given for OPV5 (black) and Rh123 (green). A red-shift in case of Rh123 can be assigned to changes due to refractive index as discussed and shown by the dashed orange curve. However, for OPV5 a clear blue-shift of around 1.2 nm is observed (see also Table 2 and the supporting information section 2).

2.5 Overall discussion

The observed force dependences of the lifetime and the measured spectral shift are significantly higher than would be expected from the matrix due to changes in the refractive index, Δn , alone^[36, 37]. Taking matrix effects due to changes in Δn into account (see table 2), only a small increase of $\Delta\tau_F$ by up to 12% and a reduction of $\Delta\lambda$ by up to 14% is expected. Thus a net effect of $\Delta\tau_F = -22 \text{ ps}$ and $\Delta\lambda = 1.25 \text{ nm}$ can be unambiguously attributed to force. In comparison with theory, these shifts then translate into an apparent mean local force on a single chromophore in a range of ca. 0.2 - 0.55 nN (see Figure 2). The uncertainty lies within the expected accuracy level of the semi empirical computations.

Due to the visco-elastic properties of the PVC matrix its extension shows only a faint reversibility with the applied force which suggests that the local environment of the fluorophores does not depend on force but on extension. This is corroborated by the orientation of the fluorophores as indicated by anisotropy which is largely dependant on extension of the foil only. However, the observed changes of fluorescence lifetime as well as the spectral shift are mainly reversible with the applied force. Altogether, this indicates only a marginal influence of the matrix on the fluorescence lifetime as well as the emission spectrum of the fluorophore. This clearly proves the concept of a fluorescent probe as a sensor for local forces.

The blue-shift of fluorescence and the reduced lifetime of OPV5 under tensile stress are qualitatively consistent with the results from semiempirical calculations. A more quantitative comparison is not feasible since the force on single OPV5 molecules is not known precisely in the experiment (apparently less than 1 nN). The experimental results seem to indicate an extremely efficient transfer of mechanical force onto the chromophore, i.e. a force per molecule that is about two orders of magnitude higher than average. Therefore a more realistic view of the process may also have to add lateral interactions of the polymer chains with the side chains of the chromophore to promote its unwinding. Unwinding of the ground state as observed in the simulated experiments for uniaxial forces can also be achieved by applying torsional forces to the side-chains. For both mechanisms we expect qualitatively similar spectroscopic effects. The presence of an additional mechanism is supported by experiments using modified OPV5 carrying polymer chains attached to the hydroxyl endgroups as possible handles to enhance coupling of external forces from the matrix to the fluorophores (not shown). No difference of the force dependant effects was observed between OPV5 and the modified OPV5.

3. Conclusion

In summary, we have explored possible applications of fluorophores as optical sensors for local mechanical forces. To that end a custom tailored chromophore consisting of an aromatic backbone strained by sterically demanding alkyloxy side-chains has been synthesized. A flexible PVC matrix served to align the fluorophores by stretching. Transfer of mechanical strain from the matrix induced a geometrical change in the chromophore. Consistent with the results of semiempirical calculations on the same system, this caused a decrease in the fluorescence lifetime by 2.5% (25 ps) and an increase of the emission energy by 0.2% which corresponds to a blue-shift of 1.2 nm at tensile stresses of 12 N mm⁻². From a different point of view the force of 0.2-0.55 nN acting on a single molecule can be interpreted as an equivalent energy difference of 0.15 – 0.8 kcal mol⁻¹ (supporting information, Table 8).

Our study proves the feasibility of fluorescence-based local force probes for polymers under tension. Necessary improvements can be achieved by developing more sensitive fluorophores and possibly by increasing the efficiency of force transmission from the matrix to the probe, i.e. by using modified end-groups to attach additional polymer chains as handles. Improved optical sensors of this type should in principle be able to monitor local mechanical stress in transparent samples down to the single molecule level, which can be used for reliability studies of the materials and also harbor promising further applications in polymer and nano science and technology.

4. Experimental Section

OPV5: The yellow crystalline solid was purified by column chromatography using a 95 to 5 mixture of chloroform and acetone as an eluent. Yield 45% (synthesis see supporting information section 1)

¹H NMR (500 MHz, [D₃]THF, 25°C, TMS): δ = 0.81 (m, 12H, CH₃), 1.27-1.34 (m, 16H, CH₂), 1.48 (m, 8H, CH₂), 1.78 (m, 8H, CH₂), 3.99 (m, 8H, CH₂), 4.06 (m, 2H, OH), 4.46 (d, 4H, CH₂), 7.11- 7.22 (m, 12H, CH), 7.38-7.46 (m, 12H, CH); MALDI-TOF MS: *m/z*: 1003[M⁺]

PVC foil: PVC (0.3 g, Aldrich, CAS# 9002-86-2, Mn: 47000) was dissolved in THF (5 mL, Prolabo, CAS# 109-99-9, AnalaR NORMAPUR) together with hexamoll® (0.045 g, BASF Ludwigshafen, CAS# 166412-78-8), a plasticizer which is necessary to make the foil flexible enough to be stretched. This solution was then cleaned with activated charcoal which was afterwards removed by centrifugation. To the polymer solution (5 mL) OPV5 (21.5 ng, 21.4 pmol, the concentration is far below excimer formation^[38]) was added and filled into a petri dish. THF was evaporated at room temperature until the foil gained its solid state. Finally the foil was dried for 5 hours under highvacuum conditions, yielding substrates with a glass-temperature of 46°C. The resulting foil showed a thickness of around 50 μ m, the exact value being determined by a z-scan of the laser focus through the sample prior and after each experiment. The effective cross section of each foil was calculated from its thickness and the width as measured by a caliper-gauge.

Fluorescence spectroscopy: The fluorescence and absorption spectra were measured with FluoroLog-3 (Jobin Yvon Horiba) and Cary-300 Bio (Varian), respectively. Time-correlated single photon counting (TCSPC) measurements were performed using a 5000 U (IBH) with a pulsed diode laser source at 471 nm (Picoquant). The combined force and fluorescence measurements were performed on a home-built setup^[39]. Linear polarized and pulsed light from a diode laser (Picoquant) at 468 nm and a repetition rate of 50 MHz is coupled into an inverted epifluorescent confocal microscope (Olympus, IX71) at a mean intensity of $I_d/2 \approx 2.5$ kW cm⁻² in a near diffraction limited focus. The fluorescence was then separated with respect to polarization parallel and perpendicular to the laser light. These two components were further split by a dichroic beamsplitter (AHF, BS560) in a "green" fraction 487-548 nm (AHF, HQ 520/66) and a "red" fraction 548-644 nm (AHF, HQ 580/130) and finally focused on single photon avalanche diodes (Micro-Photon-Devices PDM 50CT (green), Perkin-Elmer SPCM-AQR-14 (red)). The signals of the detectors were recorded by two synchronized time-correlated single photon counting pc-boards (Becker & Hickl, SPC-150). In order to minimize photobleaching, for each data point a xy-scan of 98x98 μ m² was performed with a piezo-scanner (PI, P-527). Taking into account an average number of ca. 360 dye molecules in the confocal detection volume element, pixel intensity distributions within each scan were shot-noise limited and gave no indication of additional heterogeneity (see supporting information section 2.7). The self-made PVC foils were stretched by a tensile stage (Deben, MTEST 200) which was mounted upside down on the inverted microscope.

Calculations: In view of the size of the OPV5 chromophore, its fluorescence lifetime was computed using semiempirical methods^[40]. Geometry optimizations were performed on two conformers of OPV5 in the ground state at the AM1/SCF level^[41], one in C₂ symmetry (with the C₂ axis perpendicular to the central aromatic ring) and the other one in C_i symmetry. Spectral properties were computed at the AM1/MRCI level at the optimized (nearly planar) excited-state geometries, in particular the radiative lifetime τ_r of the first excited singlet state.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 663, Projects B4 and C4). The authors thank Dr. S. Kalinin and Dr. S. Felekyan.

Keywords: Analytical Chemistry · Optical Properties · Fluorescence Spectroscopy · Organic Chemistry · Theoretical Chemistry

Literature

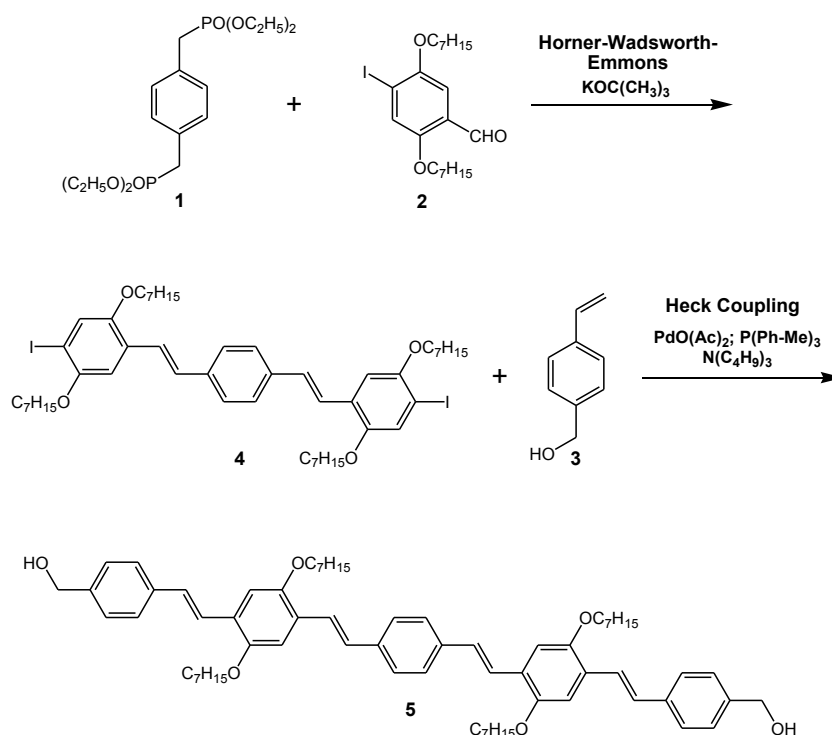
- [1] C. Löwe, C. Weder *Adv. Mater.* **2002**, 14, 1625-1629.
- [2] J. W. Hofstraat, J. Veurink, B. Gebben, H. J. Verheij, J. W. Verhoeven *J. Fluoresc.* **1998**, 8, 335-342.
- [3] T. Ikawa, T. Shiga, A. Okada *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, 83, 2600-2603.
- [4] H. Springer, R. Neuert, F. D. Müller, G. Hinrichsen *Colloid Polym. Sci.* **1983**, 261, 800-804.
- [5] T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. Seitz, H. E. Gaub *Science* **2002**, 296, 1103-1106.
- [6] U. F. Röhrig, U. Troppmann, I. Frank *Chem. Phys.* **2003**, 289, 381-388.
- [7] S. Tretiak, A. Saxena, R. L. Martin, A. R. Bishop *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 097402.
- [8] H. Meier, U. Stalmach, H. Kolshorn *Acta Polym.* **1997**, 48, 379-384.
- [9] F. Schindler, J. M. Lupton, J. Feldmann, U. Scherf *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 14695-14700.
- [10] D. A. Vanden Bout, W. T. Yip, D. Hu, D. K. Fu, T. M. Swager, P. F. Barbara *Science* **1997**, 277, 1074-1077.
- [11] K. Becker, E. Da Como, J. Feldmann, F. Scheliga, E. Thorn Csányi, S. Tretiak, J. M. Lupton *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 4859-4864.
- [12] H.-J. Egelhaaf, J. Gierschner, D. Oelkrug *Synth. Met.* **1996**, 83, 221-226.
- [13] J. Gierschner, M. Ehni, H.-J. Egelhaaf, B. M. Medina, D. Beljonne, H. Benmansour, G. C. Bazan *J. Chem. Phys.* **2005**, 123, 9.
- [14] M. Bothe, G. Schmidt-Naake *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, 24, 609-613.
- [15] R. A. W. Johnstone, M. E. Rose *Tetrahedron* **1979**, 35, 2169-2173.
- [16] Z. Bao, Y. Chen, R. Cai, L. Yu *Macromolecules* **1993**, 26, 5281-5286.
- [17] D. A. M. Egbe, C. P. Roll, E. Birkner, U. W. Grummt, R. Stockmann, E. Klemm *Macromolecules* **2002**, 35, 3825-3837.
- [18] T. Maddux, W. J. Li, L. P. Yu *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 844-845.
- [19] J. R. Fries, L. Brand, C. Eggeling, M. Köllner, C. A. M. Seidel *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 6601-6613.
- [20] R. E. Di Paolo, J. S. de Melo, J. Pina, H. D. Burrows, J. Morgado, A. L. Macanita *ChemPhysChem* **2007**, 8, 2657-2664.
- [21] J. A. Odell, A. Keller *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **1986**, 24, 1889-1916.
- [22] M. Klessinger, J. Michl, *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*, VCH, Weinheim, **1989**.
- [23] F. C. Spano *Chem. Phys.* **2002**, 116, 5877-5891.
- [24] T. Damerau, M. Hennecke *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, 6232-6240.
- [25] J. G. Rider, E. Hargreaves *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1970**, 3, 993-1008.
- [26] S. A. Jabarin *Polym. Eng. Sci.* **1991**, 31, 638-643.
- [27] L. Horner *J. Makromol. Chem.* **1943**, 1, 234-246.
- [28] A. Ajji, M. C. Renaud *J. Appl. Polym. Sci.* **1991**, 42, 335-345.
- [29] Y. Shindo, B. E. Read, R. S. Stein *Macromol. Chem. Phys.* **1968**, 118, 272-8.
- [30] B. Yalcin, M. Cakmak *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **2005**, 43, 724-742.
- [31] M. E. R. Robinson, D. I. Bower, W. F. Maddams *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **1978**, 16, 2115-2138.
- [32] H. S. Ozkan, T. Oskay, H. Y. Guney, H. Dirim *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **1994**, 32, 631-640.
- [33] D. Topytgin *J. Fluoresc.* **2003**, 13, 201-219.
- [34] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub *Science* **1999**, 283, 1727-1730.
- [35] L. Onsager *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 1486-1493.
- [36] C. N. R. Rao, S. Singh, V. P. Senthilnathan *Chem. Soc. Rev.* **1976**, 5, 297-316.
- [37] J. Gierschner, H. G. Mack, L. Lüer, D. Oelkrug *J. Chem. Phys.* **2002**, 116, 8596-8609.
- [38] B. R. Crenshaw, C. Weder *Adv. Mater.* **2005**, 17, 1471-1476.
- [39] J. Widengren, V. Kudryavtsev, M. Antonik, S. Berger, M. Gerken, C. A. M. Seidel *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2039-2050.
- [40] A. Koslowski, M. E. Beck, W. Thiel *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 714-726.
- [41] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902-3909.

Fluorophors as Optical Sensors for Local Forces (Supporting Information)

Stefan Marawske, Denis Dörr, Daniel Schmitz, Axel Koslowski, You Lu, Helmut Ritter*, Walter Thiel *, Claus A.M. Seidel* and Ralf Kühnemuth*

1) Synthesis

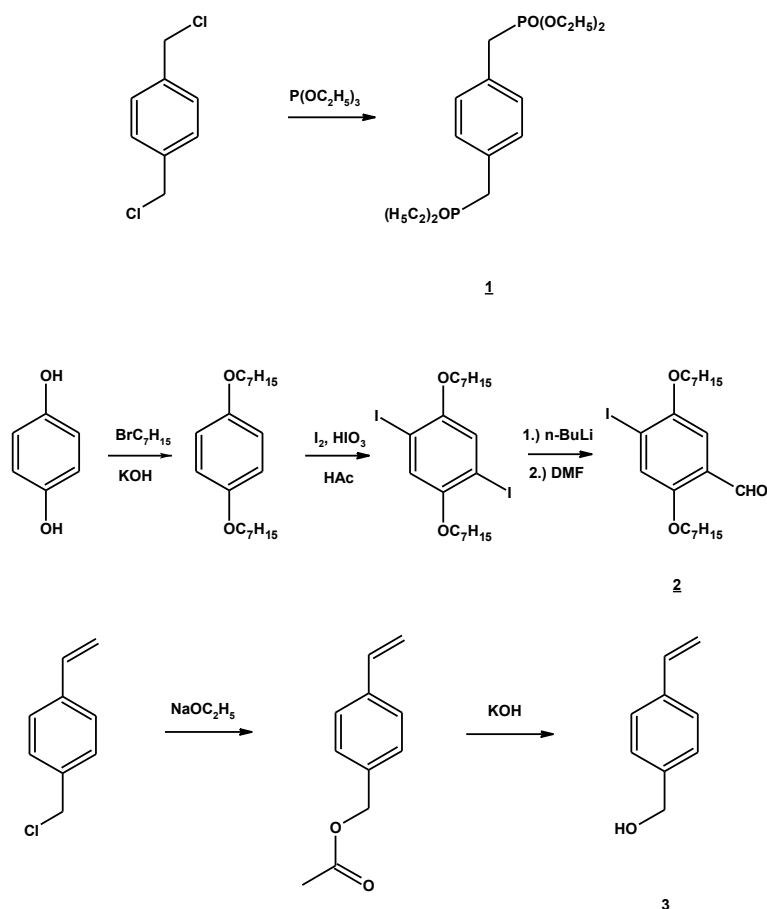
The oligo(paraphenylenevinylene)-type fluorophor **5** was synthesized in a stepwise procedure shown in *Scheme 1*. In a first step the double Horner-Wadsworth-Emmons reaction of the phosphonate ester **1** and the aldehyde **2** gave the bis(iodo)-compound **4**, which was subsequently reacted with 4-vinylbenzyl alcohol **3** in terms of a Heck reaction to form the wanted OPV5 diol **5**.^[1]



Scheme 1: Stepwise synthesis of the oligo(paraphenylenevinylene)-type fluorophor **5**

The building blocks **1** to **3** were obtained as shown in *Scheme 2*. The phosphonate ester **1** was obtained in an Arbuzov-type reaction using 1,4-bis-(chloromethyl)benzene and triethyl phosphite as educts. Furthermore, hydroquinone, as a starting material, was etherified with 1-bromoheptane to generate 1,4-bis(heptyloxy)-benzene. The iodation of the ether gave 1,4-bis(iodo)-2,5-bis(heptyloxy)-benzene. On treatment with butyllithium and

subsequent addition of dimethylformamide building block **2** was formed. 4-Vinylbenzyl chloride was treated with sodium acetate to form 4-vinylbenzyl acetate. The following saponification gave 4-vinylbenzyl alcohol **3**.^[1-4]



Scheme 2: Synthesis of the monomeric buildingblocks **1** to **3**

Materials and Instruments

The chemical reagents were purchased from Acros or Aldrich Corp. and were used as received unless otherwise stated. All solvents were purified according to standard procedures. Column chromatography was performed on silica gel. NMR spectra were obtained on a Bruker Avance DRX 500 spectrometer at 500.13 MHz. MALDI-TOF MS measurements were performed on a Bruker Ultraflex TOF mass spectrometer.

Compounds

4-Formyl-1-iodo-2,5-bis(heptyloxy)benzene **2** and 4-vinylbenzyl alcohol **3** were synthesized according to literature proceedings.^[2-4]

p-Xylylen-bis(diethyl)phosponate 1

A mixture of 1,4-bis(chloro-methyl)benzene (17.51 g, 0.1 mol) and triethyl phosphite (49.85 g, 0.3 mol) was slowly heated to 150-160°C. Simultaneously the emerging ethyl chloride was distilled off. After 4 hours of reaction time the mixture was heated to 180 °C and vacuum was applied for 1 hour to remove excessive triethyl phosphite. After cooling to room temperature p-xylylen-bis(diethyl)-phosponate 1 was obtained in form of a colourless crystalline solid in quantitative yield.

¹H NMR (500 MHz, [D₁]CHCl₃, 25°C, TMS) δ = 1.17 (m, 12H, CH₃), 3.06 (d, 4H, CH₂), 3.94 (m, 8H, CH₂), 7.18 (s, 4H, CH)

Diiodo compound 4

A solution of 4-formyl-1-iodo-2,5-bis(heptyloxy)benzene 2 (4.60 g, 10 mmol) and p-xylylen-bis(diethyl)phosphonate 1 (1.89 g, 5 mmol) in dry toluene (20 mL) was heated to reflux under nitrogen atmosphere. In the course a suspension of potassium *tert*-butoxide (2.24 g, 20 mmol) in dry toluene was added bit by bit to the boiling solution. The mixture was refluxed for 3 hours under vigorous stirring. Subsequently hydrochloric acid (5%, 40 mL) was added. The organic phase was washed with water to neutrality and dried over magnesium sulfate. The solvent was removed under reduced pressure. The resulting pale yellow crystalline solid was purified by column chromatography using a 9 to 1 mixture of toluene and ethanol as an eluent. Yield 65%.

¹H NMR (500 MHz, [D₁]CHCl₃, 25°C, TMS) δ = 0.83 (m, 12H, CH₃), 1.26-1.32 (m, 16H, CH₂), 1.45 (m, 8H, CH₂), 1.78 (m, 8H, CH₂), 3.89-3.95 (m, 8H, CH₂), 6.96 (s, 2H, CH), 7.06 (d, 2H, CH), 7.21 (s, 2H, CH), 7.35 (d, 2H, CH), 7.43 (s, 2H, CH); MALDI-TOF MS: *m/z*: 991[M⁺]

OPV diol 5

Under nitrogen atmosphere diiodo compound 4 (445 mg, 0.5 mmol), 4-vinylbenzyl alcohol 3 (135 mg, 1 mmol), tri(o-tolyl)phosphine (31 mg, 0.1 mmol) and palladium acetate (4.5 mg, 0.02 mmol) were solved under vigorous stirring in DMF (5 mL). Subsequently tributylamine (530 μ L, 1.1 mmol) was added. The reaction mixture was heated to 80°C for 2 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature and the product was precipitated in cold water, filtered off and dried. The resulting yellow crystalline solid was purified by column chromatography using a 95 to 5 mixture of chloroform and acetone as an eluent. Yield 45%.

¹H NMR (500 MHz, [D₈]THF, 25°C, TMS): δ = 0.81 (m, 12H, CH₃), 1.27-1.34 (m, 16H, CH₂), 1.48 (m, 8H, CH₂), 1.78 (m, 8H, CH₂), 3.99 (m, 8H, CH₂), 4.06 (m, 2H, OH), 4.46 (d, 4H, CH₂), 7.11- 7.22 (m, 12H, CH), 7.38-7.46 (m, 12H, CH); MALDI-TOF MS: *m/z*: 1003[M⁺]

- [1] M. Bothe, G. Schmidt-Naake, *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, 24, 609.
- [2] R. A. W. Johnstone, M. E. Rose, *Tetrahedron* **1979**, 35, 2169.
- [3] Z. Bao, Y. Chen, R. Cai, L. Yu, *Macromolecules* **1993**, 26, 5281.
- [4] D. A. M. Egbe, C. P. Roll, E. Birckner, U. W. Grummt, R. Stockmann, E. Klemm, *Macromolecules* **2002**, 35, 3825.

2) FORCE AND FLUORESCENCE EXPERIMENTS

The fluorescence and absorption spectra were measured with FluoroLog-3 (Jobin Yvon Horiba) and Cary-300 Bio (Varian), respectively. Time-correlated single photon counting (TCSPC) measurements were performed using a 5000 U (IBH) with a pulsed diode laser source at 471 nm (Picoquant).

2.1 The fluorescence quantum yield of OPV5 in THF

The fluorescence quantum yield of OPV5 ($\Phi_F(\text{OPV5})$) is determined with the help of Eq. 1^[5],

$$\Phi_F(\text{OPV5}) = \Phi_F(\text{Rh110}) \frac{F_{\text{opv5}} \cdot E_{\text{Rh110}} \cdot n_{\text{THF}}^2}{F_{\text{Rh110}} \cdot E_{\text{opv5}} \cdot n_{\text{water}}^2} \quad (1)$$

where F is the integrated fluorescence intensity, E is the optical density, $n_{\text{THF}}=1.407$ and $n_{\text{water}}=1.339$. As a reference, Rhodamine 110 was used with a quantum yield of $\Phi_F(\text{Rh110}, \text{EtOH}) = 0.92$ measured in EtOH.^[6] From this the corresponding quantum yield in water was derived to $\Phi_F(\text{Rh110}, \text{H}_2\text{O}) = 0.95$ (OPV5 was solved in THF whereas Rh110 was solved in water). Given all this, the fluorescence quantum yield of OPV5 was calculated to $\Phi_F(\text{OPV5}) = 0.53 \pm 0.05$.

2.2 Estimation of maximum force per polyvinylchloride molecule

With the molecular mass of PVC of $M_n = 47000$ g/mol and the density of $\rho = 1.3927$ g/cm³ the mean molecular volume can be calculated with Eq. 2,

$$V_{\text{molec}} = \frac{M_n}{\rho \cdot N_A} = 56.04 \text{ nm}^3 \quad (2)$$

where N_A is Avogadro's constant. As the molecular mass of a PVC monomer is $M_n(\text{mono}) = 62.5$ g/mol the average PVC molecule consists of around $N_{\text{mono}} = 752$ monomers.

The length of an average molecule can be estimated from Eq. 3,

$$L_{\text{molec}} = N_{\text{mono}} \cdot 2 \cdot L_{\text{C-C}} \cdot \sin(54.74^\circ) = 189 \text{ nm} \quad (3)$$

where $L_{\text{C-C}} = 0.1541$ nm is the typical length of a C-C bond.^[7] The corresponding mean cross section of the polymer chain is obtained by Eq. 4.

$$A_{molec} = \frac{V_{molec}}{L_{molec}} = 0.296 \text{ nm}^2 \quad (4)$$

Assuming a maximum mean tensile stress in our experiments of ca. 12 N/cm², we arrive at a maximum mean force on a single PVC molecule of $F_{molec} = 3.55 \text{ pN}$.

This is only a mean value assuming a homogeneous force distribution in the substrate.

2.3 Estimation of the change of radiative lifetimes due to refractive index variations

Radiative lifetimes of excited states and energetic positions of ground and excited state are known to depend on the refractive index of the environment due to local electric fields acting on the molecular dipole moments. We first discuss the refractive index of PVC as a function of external strain (a), then estimate its influence on the optical properties of OPV5 in the limit of simple approximations (b, c) and finally summarize our results in tabular form (d):

(a) The index of refraction of the PVC matrix under tensile stress could not be measured in the thin foils directly. A rough estimation was performed using properties of stretched PVC from literature.

Using reported density changes from $\rho_0 = 1.3927 \text{ g/cm}^3$ at zero extension to $\rho = 1.3937 \text{ g/cm}^3$ at 100% extension^[8] and applying the Lorentz-Lorenz equation:

$$n = \sqrt{\frac{M_w + 2\rho RD}{M_w - \rho RD}}; \quad RD = \frac{M_w}{\rho} \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \quad (5)$$

With the molecular weight $M_w = 80000 \text{ g/mol}$ we obtain a molar refraction of the polymer of $RD = 17800 \text{ cm}^3/\text{mol}$. An initial index of refraction of $n = 1.532$ ^[9] would increase by $\Delta n = 4.6 \times 10^{-4}$ upon stretching.

Birefringence of stressed PVC can exhibit much higher variations in n . For similar samples $\Delta n \approx 3.1 \times 10^{-3}$ at 100% extension has been reported.^[8, 10] Depending on the orientation of the chromophore inside the matrix this would be the upper limit for stress-induced refractive index variations that could affect the radiative lifetime.

(b) Changes in radiative lifetimes can be calculated according to Toptygin by a modified Strickler-Berg approach.^[11]

The empty spherical cavity model (ESC, Toptygin, eq. 59) was found to successfully describe radiative lifetimes of small fluorophores in solution:

$$k_r = (\tau_r)^{-1} = \left(\frac{3n^2}{2n^2 + 1} \right)^2 n k_{r,0} \quad (6a)$$

$$\frac{\tau_{r,2}}{\tau_{r,1}} = \left(\frac{n_1}{n_2} \right)^5 \left(\frac{2n_2^2 + 1}{2n_1^2 + 1} \right)^2$$

$$\Rightarrow \Delta \tau_r = \tau_{r,2} - \tau_{r,1} = \tau_{r,1} \left(\left(\frac{n_1}{n_2} \right)^5 \left(\frac{2n_2^2 + 1}{2n_1^2 + 1} \right)^2 - 1 \right) \quad (6b)$$

$\tau_{r,1}$ and n_1 are radiative lifetime and index of refraction in the relaxed foil; $n_2 = n_1 + \Delta n$.

The empty ellipsoidal cavity model (EEC) yields a more appropriate description for chromophores deviating significantly from a spherical shape. In the limit of transition dipoles aligned along the long axis of the cavity radiative decay rates are directly proportional to n (Toptygin, eq. 63 with $L_\mu = 0$):

$$k_r = (\tau_r)^{-1} = n k_{r,0} \quad (7a)$$

$$\frac{\tau_{r,2}}{\tau_{r,1}} = \frac{n_1}{n_2}$$

$$\Rightarrow \Delta \tau_r = \tau_{r,2} - \tau_{r,1} = \tau_{r,1} \left(\frac{n_1}{n_2} - 1 \right) \quad (7b)$$

(c) Solvatochromic shifts of the emission can be estimated using Onsager theory as extended by Mataga et al.:^[12-14]

$$\nu = \nu_0 + \text{const.} \left(\frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \quad (8)$$

where ν is the emission frequency.

From the emission maximum of OPV5 in THF of 485.2 nm and in PVC of 491.6 nm and the respective indices of refraction of $n_{\text{THF}} = 1.407$ and $n_{\text{PVC}} = 1.532$ the equation yields $\nu_0 = 21968 \text{ cm}^{-1}$ and $\text{const.} = -6875 \text{ cm}^{-1}$. The value of the slope is within the range of other reported OPV derivatives.^[15]

(d) The fluorescence quantum yield of OPV5 in the relaxed PVC matrix, $\Phi_F(\text{OPV5, PVC})$, was estimated from the measured yield in THF, $\Phi_F(\text{OPV5, THF}) = 0.53$ (see also 2.1), by scaling the radiative decay rate using the empty spherical cavity model:

$$\Phi_F(OPV5, PVC) = \frac{\tau_{F,PVC}}{\tau_{r,PVC}}$$

$$\approx \frac{\tau_{F,PVC}}{\tau_{r,THF} \left(\frac{n_{THF}}{n_{PVC}} \right)^5 \left(\frac{2n_{PVC}^2 + 1}{2n_{THF}^2 + 1} \right)^2} = \Phi_F(OPV5, THF) \frac{\tau_{F,PVC}}{\tau_{F,THF}} \left(\frac{n_{PVC}}{n_{THF}} \right)^5 \left(\frac{2n_{THF}^2 + 1}{2n_{PVC}^2 + 1} \right)^2 \quad (9)$$

With $n_{THF} = 1.407$, $n_{PVC} = 1.532$, $\tau_{F, THF} = 0.781$ ns and $\tau_{F, PVC} = 1.03$ ns results $\Phi_F(OPV5, PVC) = 0.81$. The corresponding radiative lifetimes are $\tau_{r,THF} = 1.47$ ns and $\tau_{r,PVC} = 1.27$ ns, respectively.

For $n_{PVC}(0\text{ N}) = 1.532$, $\tau_{r,OPV,PVC}(0\text{ N}) = 1.27$ ns and $\Phi_F(OPV5, PVC) = 0.81$ (0 N) the predicted changes in τ_r , τ_F and λ due to variations in n after stretching are:

Δn	$\Delta\tau_r(\text{ESC})$ [ps]	$\Delta\tau_r(\text{EEC})$ [ps]	$\Delta\tau_F(\text{ESC})$ [ps]	$\Delta\tau_F(\text{EEC})$ [ps]	$\Delta\lambda$ [nm]
4.6×10^{-4}	-0.64 (0.05%)	-0.38 (0.03%)	-0.42 (0.04%)	-0.25 (0.02%)	0.022
3.1×10^{-3}	-4.36 (0.34%)	-2.56 (0.20%)	-2.87 (0.28%)	-1.69 (0.16%)	0.146

Table 1: Influence of the refractive index on the radiative and fluorescence lifetime assuming different cavity models for OPV5

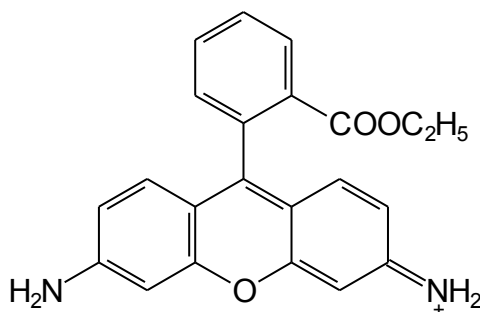
Since the OPV5 chromophore is neither spherically shaped nor infinitely extended, the best approximation probably lies between the solutions of the ESC and the EEC models. $\Delta n = 3.1 \times 10^{-3}$ from birefringence measurements is an upper limit and probably overestimates the true condition in the polymer.

Corresponding results for Rhodamine123 with $\tau_{F,Rh123,H_2O} = 3.95$ ns, $\Phi_F(Rh123, H_2O) = 0.95$ and $\tau_{F,Rh123,PVC}(0\text{ N}) = 3.12$, giving $\tau_{r,Rh123,PVC}(0\text{ N}) = 3.24$ ns and $\Phi_F(Rh123, PVC) = 0.96$ (0 N):

Δn	$\Delta\tau_r(\text{ESC})$ [ps]	$\Delta\tau_F(\text{ESC})$ [ps]	$\Delta\lambda$ [nm]
4.6×10^{-4}	-1.59 (0.05%)	-1.47 (0.05%)	0.063
3.1×10^{-3}	-10.71 (0.33%)	-9.92 (0.32%)	0.42

Table 2: Influence of the refractive index on the radiative and fluorescence lifetime assuming different cavity models for Rh 123

2.4 Negative control with Rh123 stained PVC foil



Scheme 3: Chemical structure of Rhodamine 123 (Rh 123)

The chromophore of Rhodamine 123 has a stiff molecular backbone and no significant external force-induced unwinding or deformation is expected under our experimental conditions. Therefore it can serve as a reference where possible lifetime effects or spectral shifts most likely are only induced by static interaction with the matrix, in particular by the local index of refraction. Experimental conditions and preparation of the foil are the same as mentioned before. Concentration of Rh 123 in PVC was also 100 nM. As shown in Figure 1, the fluorescence anisotropy also correlates with the extension of the foil but much less pronounced than in the case of OPV5. The fluorescence lifetime and the green to red signal ratio do not show any significant change dependant on the mean tensile stress within the statistical limits.

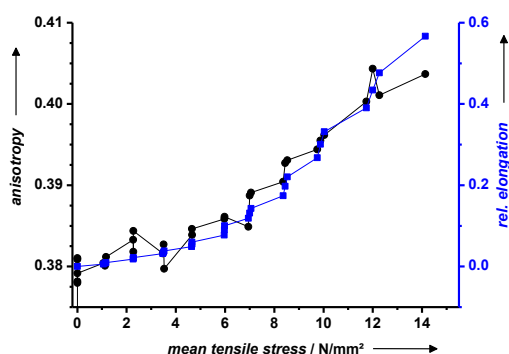


Figure 1: Relative elongation (blue) of the PVC foil and fluorescence anisotropy (black) of Rh 123 versus the mean tensile stress

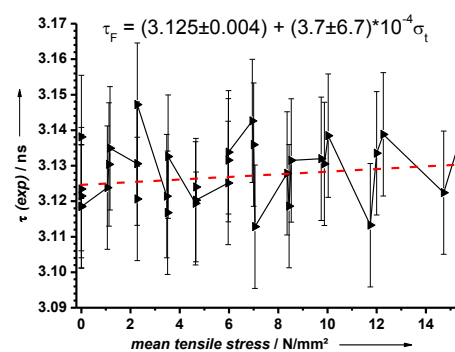


Figure 2: Fluorescence lifetime τ of Rh 123 vs. mean tensile stress with linear regression ($\Delta\tau_F = 4 \pm 8$ ps at 12 N/mm²).

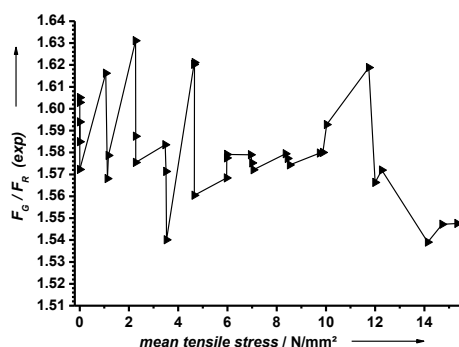


Figure 3a: Green to red ratio from experiment versus mean tensile stress for Rh 123

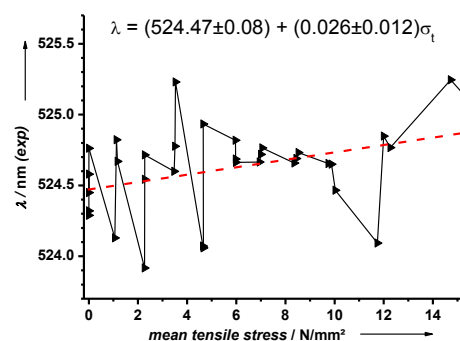


Figure 3b: Spectral position vs. mean tensile stress for Rh 123 with linear regression. ($\Delta\lambda = 0.31 \pm 0.14$ nm at 12 N/mm²)

2.5 Variations of the PVC matrix

In our experiments we observe different elasticities depending on the preparation condition of the foil.

(a) As a first example we present the extended results of the experiment already shown in the paper. As the tensile stage has a limited range of travel of 10mm, the foil was stretched in two steps. After the first pull the stage was returned to its starting position and the foil was readjusted for the second pull. After the first cycle the fluorescence lifetime (Figure 4) as well as the green to red intensity ratio (Figure 5) does not completely return to the initial values. After the second cycle both values almost return to the initial values. Here, the polymer molecules were already much more ordered in comparison to the unstretched foil, which results in a higher elasticity of the matrix.

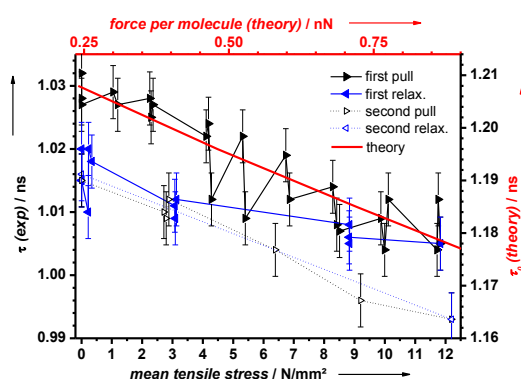


Figure 4: Comparison between fluorescence lifetime measurement and theory; the PVC foil was stretched in two steps (black) each with a relaxation (blue) afterwards; the fluorescence lifetime τ decreases with higher mean tensile stress, the statistical error of the lifetime fits was about 4 ps each; the maximum reduction is about 25 ps

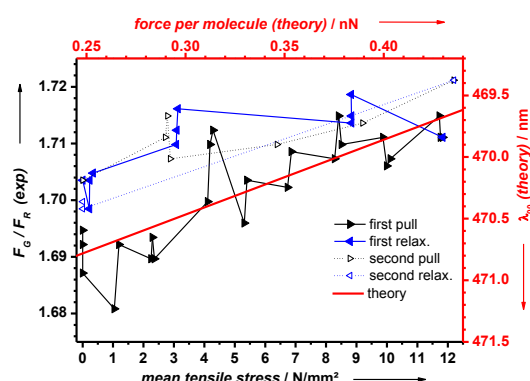


Figure 5: Green to red ratio from experiment versus mean tensile stress; the PVC foil was stretched in two steps (black) each with a relaxation (blue) afterwards

(b) As a second example we present a different type of measurement with less flexibility of the matrix although prepared under the same procedure as before. Here, a higher mean tensile stress was applied to the polymer matrix. The anisotropy (Figure 6), the fluorescence lifetime (Figure 7) and the green to red intensity signal ratio (Figure 8) all show more pronounced effects as discussed before, but for all these parameters there is a plateau up to 14 N/mm² where there is nearly no change. This indicates that the polymer matrix is much stiffer and all the energy is needed at first to stretch the matrix before it is transferred to the fluorophores

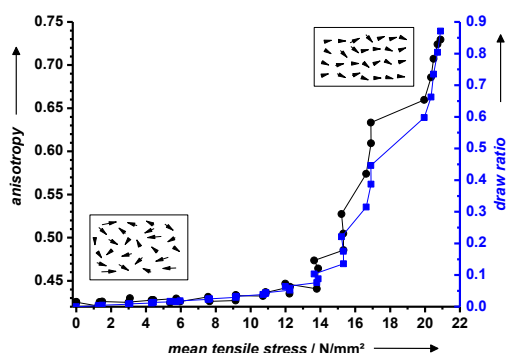


Figure 6: Relative elongation (blue) of the PVC foil and fluorescence anisotropy (black) of OPV5 versus the mean tensile stress

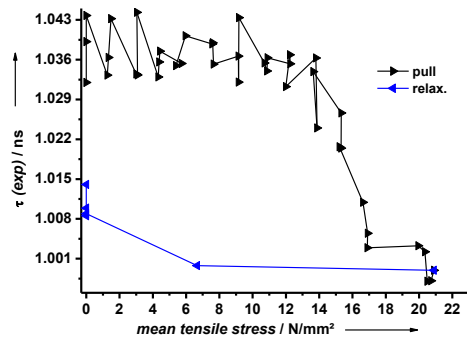


Figure 7: Fluorescence lifetime of OPV5 dependant on the mean tensile stress; a total lifetime change of 40 ps can be found.

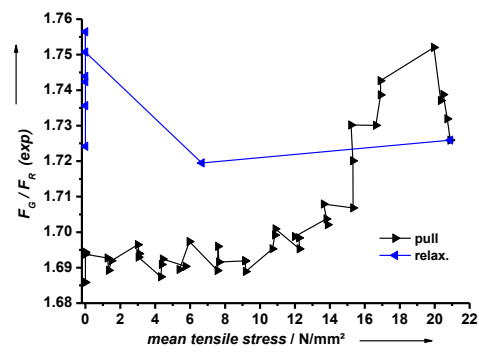


Figure 8: Green to red ratio from experiment versus mean tensile stress

2.6 Statistics

slope $\left[\frac{ns \cdot mm^2}{N} \right]$	
	error
-1.9×10^{-3}	1.4×10^{-4}
-2.1×10^{-3}	2.1×10^{-4}
-1.7×10^{-3}	2.4×10^{-4}
-2.8×10^{-3}	2.7×10^{-4}
-2.2×10^{-3}	2.6×10^{-4}
average	std
-2.14×10^{-3}	4.0×10^{-4}

Table 3: From different measurements the slope of the linear decreasing lifetime (e.g. see Figure 7) dependant on the mean tensile stress was fitted by linear regression.

2.7 Sample heterogeneity

To characterize spatial heterogeneity the intensity distribution for pixels in a single scan of an OPV5-doped foil was analyzed. From comparison of the width of the fitted gaussian of 25.5 ± 0.5 with the shot-noise according to a mean number of 285 of $(285)^{0.5} = 16.9$ we find a mean number of fluorophores per detection volume element of $N \approx (25.5^2 - 16.9^2) = 365$ as being responsible for the additional broadening of the distribution.

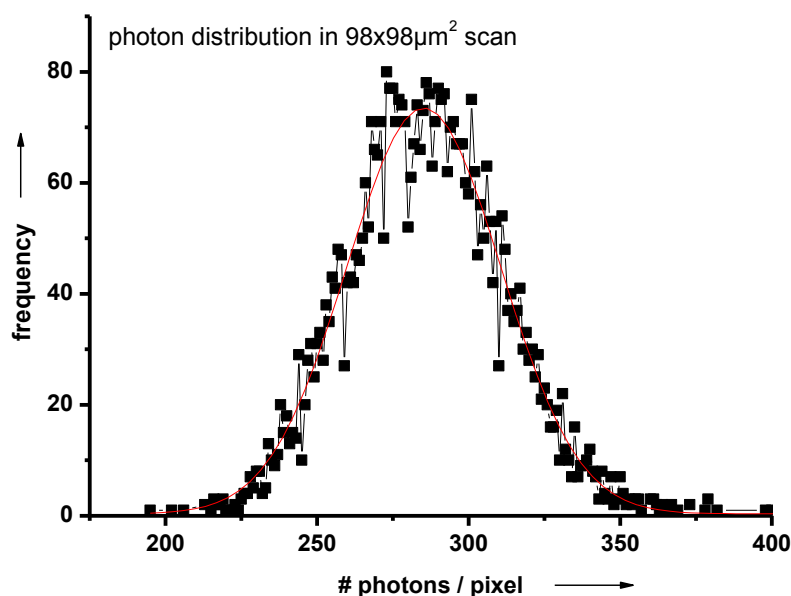


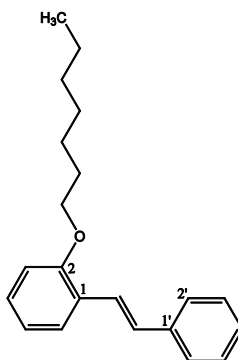
Figure 9: Photon distribution for single scan of OPV5-doped PVC foil with fitted gaussian (center $x_c = 285$, $\sigma = 25.5$).

- [5] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- [6] R. F. Kubin, A. N. Fletcher, *J. Lumines.* **1982**, 27, 455.
- [7] Handbook of Chemistry and Physics, 65th ed. (Ed.: R. C. Weast), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, **1984**.
- [8] S. A. Jabarin, *Polym. Eng. Sci.* **1991**, 31, 638.
- [9] L. Horner, *J. Makromol. Chem.* **1943**, 1, 234.
- [10] J. G. Rider, E. Hargreaves, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1970**, 3, 993.
- [11] D. Toptygin, *J. Fluoresc.* **2003**, 13, 201.
- [12] L. Onsager, *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 1486.
- [13] N. Mataga, Y. Kaifu, M. Koizumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1955**, 28, 690.
- [14] N. Mataga, Y. Kaifu, M. Koizumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, 29, 465.
- [15] J. Gierschner, H. G. Mack, L. L  er, D. Oelkrug, *J. Chem. Phys.* **2002**, 116, 8596.

3) THEORETICAL CALCULATIONS

In view of its size, the OPV5 chromophore was described by semiempirical methods. The theoretical study involved the selection of the most suitable semiempirical model, computation of ground-state potential curves for elongation of the chromophore, reoptimization of the resulting geometries in the first excited singlet state using multi-reference configuration interaction (MR-CI) methods^[16], and calculation of spectral properties at this level.

Evaluation of the semiempirical methods



Scheme 4: Numbering of atoms in Heptoxystilbene.

To evaluate the performance of semiempirical methods, geometry optimizations and frequency analyses were carried out for three small model compounds at standard semiempirical, density functional, and ab initio levels. The results for *E*-stilbene are listed in Table 4. All applied methods agree that the potential energy surface of this molecule is very flat (very low frequencies) with respect to the torsion of the phenyl rings against the plane of the central double bond. B3LYP, PM3 and SCC-DFTB predict a C_{2h} symmetric planar minimum, in contrast to the other methods listed in the table, for which the C_{2h} structure represents a second-order transition state and the minima have C_2 and C_i symmetry. The relative energies of these conformers are all very close (less than 1 kcal/mol in all cases).

Table 5 shows the results for phenetole (ethoxybenzene). In this case two C_2 conformations were considered, one with the side chain heavy atoms lying within the plane of the aromatic ring, and the other one with these atoms forming a plane orthogonal to the ring plane. All applied methods agree that the in-plane side chain conformation corresponds to a local minimum which has a lower energy than the out-of-plane side chain conformation. According to HF/6-31G**, the latter conformation is also a local minimum, in contrast to the other methods, which give a first-order saddle point.

In Table 6, stable conformations of heptoxystilbene (see Scheme 4) computed with various methods are listed. All applied methods except PM3

result in two conformers with an all-staggered side chain, one with the side chain heavy atoms being approximately coplanar to the adjacent aromatic ring, and the other one with these atoms forming a plane essentially perpendicular to the ring plane. For these methods except OM3, the conformer with the in-plane side chain is more stable. The planes of the aromatic rings and of the central double bond do not coincide. With PM3, we have found two conformers with the side chain pointing out of the plane of the adjacent aromatic ring, being tilted towards the second ring.

Method	Symmetry	Structure	Relative Energy kcal/mol	Dihedral Angle Deg	Lowest Vibrations cm ⁻¹	
HF/6-31G**	C ₂	minimum	0.00	24.0	A _u	30
	C _i	minimum	0.24	19.2	A _u	16
	C _{2h}	second-order saddle point	0.36	0.0	B _g	-63
					A _u	-25
MP2/6-31G**	C ₂	minimum	0.00	26.7	A _u	36
	C _i	minimum	0.18	25.7	A _u	28
	C _{2h}	second-order saddle point	0.74	0.0	B _g	-116
					A _u	-32
B3LYP/6-31G**	C _{2h}	minimum		0.0	A _u	7
					A _u	60
					B _g	68
					B _u	82
B3LYP/cc-pVTZ	C _{2h}	minimum		0.0	A _u	3
					A _u	58
					B _g	65
					B _u	80
AM1	C ₂	minimum	0.00	22.9	A _u	24
	C _i	minimum	0.09	20.7	A _u	17
	C _{2h}	second-order saddle point	0.21	0.0	B _g	-61
					A _u	-20
PM3	C _{2h}	minimum		0.0	A _u	31
					A _u	56
					B _u	99
					B _g	101
OM2	C ₂	minimum	0.00	31.6	A _u	24
	C _i	minimum	0.21	28.4	A _u	16
	C _{2h}	second-order saddle point	0.42	0.0	B _g	-56
					A _u	-20
OM3	C ₂	minimum	0.00	30.2	A _u	20
	C _i	minimum	0.15	25.9	A _u	12
	C _{2h}	second-order saddle point	0.25	0.0	B _g	-41
					A _u	-16
SCC-DFTB	C _{2h}	minimum		0.0	A _u	27
					A _u	54
					B _u	85
					B _g	95

Table 4: Structures and lowest vibrations of E-stilbene calculated with various methods.

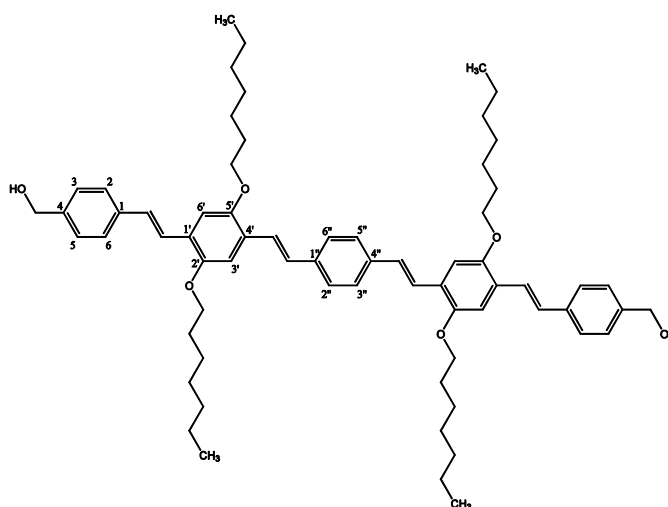
Method	In-plane side chain			Out-of-plane side chain		
	Rel. Energy kcal/mol	Lowest Vibration cm ⁻¹		Rel. Energy kcal/mol	Lowest Vibration cm ⁻¹	
HF/6-31G**	0.00	A	60	1.19	A	43
MP2/6-31G**	0.00	A	59	2.05	A	-14
B3LYP/6-31G**	0.00	A	63	2.87	A	-35
AM1	0.00	A	38	1.49	A	-55
PM3	0.00	A	34	0.86	A	-55
OM3	0.00	A	33	0.39	A	-48

Table 5: Relative energies and lowest vibrations of C_ss of phenetole (ethoxybenzene) calculated with various methods.

Method	Rel. Energy kcal/mol	Dihedral Angles (deg)			
		1- -2-O-C 1'- -2'	2-O-C-C	2--1-C=C	C=C-
HF/6-31G**	0.00	-179.7	180.0	149.7	-22.3
	0.47	-92.6	179.8	150.8	-22.3
B3LYP/6-31G**	0.00	-178.7	-179.0	163.4	-8.0
	2.27	-95.1	-178.4	162.6	-9.7
AM1	0.00	-179.7	179.8	159.5	-21.0
	1.13	-83.7	178.5	158.1	-22.2
PM3	0.00	-74.9	129.5	168.5	10.8
	0.00	-78.9	122.0	157.2	33.0
OM3	0.00	-97.0	-178.8	152.9	-26.2
	0.21	-173.5	176.6	157.2	-25.7

Table 6: Relative energies and geometric parameters of stable heptoxystilbene structures calculated with various methods. In the notation for the dihedral angles, -, =, and - - denote single, double, and aromatic bonds, respectively.

Ground-state optimizations and vertical excitations of OPV5



Scheme 5: Numbering of atoms in OPV5.

Geometry optimizations were performed on two conformers of OPV5 in the ground state at the AM1/SCF level, one in C_2 symmetry (with the C_2 axis perpendicular to the central aromatic ring) and the other one in C_i symmetry. Both conformers carry hydroxymethyl end groups and are local minima according to frequency analysis. After the initial full optimizations the distance r_{AB} of the outermost ring carbons was increased in steps of 0.1 Å or 0.2 Å and fixed during subsequent partial geometry optimizations. In Figure 10, the resulting relative energies of the elongated conformers and the corresponding forces are plotted against the distance of the outermost ring carbons. Forces were computed by analytical differentiation of a cubic-spline fit of the computed potential curves. It is obvious from Figure 10 that both conformers show essentially the same harmonic behavior upon elongation.

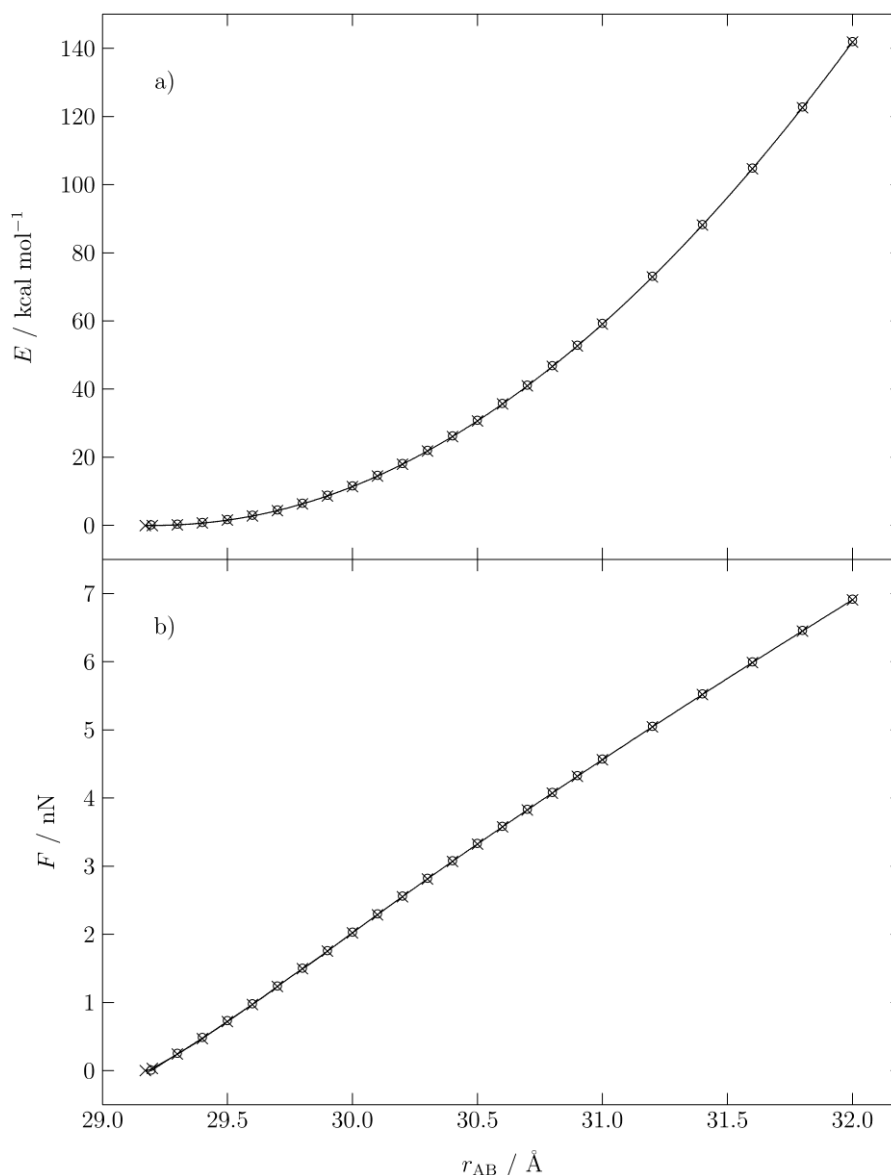


Figure 10: a) Ground-state potential curves and b) corresponding forces for stretching the OPV5 chromophore. × C_2 conformer, ° C_i conformer.

The geometries resulting from the ground state optimizations were used to compute the properties of the vertical excitation into the first excited state. A comparison of the performance of different CI expansions using the same geometry is shown in Table 7. Table 8 gives an overview over the computed data. The force F has been converted to nN using the following formula, where $N_A = 6.022142 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ is Avogadro's constant.

$$\frac{1 \text{ kcal mol}^{-1} \cdot 4184 \text{ J kcal}^{-1}}{1 \text{ \AA} \cdot N_A} = \frac{1 \text{ kcal mol}^{-1} \cdot 4184 \text{ J kcal}^{-1}}{10^{-10} \text{ m} \cdot 6.022142 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}} = 6.947694 \cdot 10^{-11} \text{ N}$$

Table 9 shows the changes of selected geometric parameters upon elongation of the C_i conformer. The non-planarity of the main chain near the minimum is essentially lost during stretching.

		CISDT	MR-CISD 10 Refs ^[1]	MR-CISD 4 Refs ^[2]	CIS
Ground state	SCF configuration	84.0%	84.1%	84.2%	100%
First excited state	HOMO→LUMO	49.2%	53.6%	53.4%	53.7%
	HOMO-1→LUMO+1	19.8%	20.1%	21.9%	23.4%
	HOMO-2→LUMO+2	5.3%	5.5%	5.5%	8.5%
Excitation energy	eV	3.00	3.11	3.14	2.87
Oscillator strength	f_{rp}	2.39	2.54	2.58	2.43
Number of CSFs		386169	139305	70185	145
CPU time (SP En. + Grad)	s (3.0 GHz Opteron)	651	165	94	41

Table 7: Comparison of calculated excited-state properties (vertical excitation) for the ground state minimum of the C_i conformer using different CI expansions with the 12 energetically highest doubly occupied and the 12 energetically lowest unoccupied molecular orbitals in the active space. [1] 1References are the ground configuration and nine singly excited configurations involving the orbitals HOMO-2 through LUMO+2; [2] References are the ground configuration and the three singly excited configurations mentioned in the table.

Distance r_{AB} $\text{\AA}$	Relative Energies kcal/mol	Force nN	First transition		Oscillator strength f_{rp}
			eV	cm^{-1}	
29.195	0.000	0	3.11	25084	2.541
29.300	0.190	0.24	3.098	24987	2.565
29.400	0.700	0.48	3.081	24851	2.596
29.500	1.570	0.72	3.068	24743	2.622
29.600	2.790	0.97	3.056	24651	2.646
29.700	4.370	1.23	3.048	24588	2.67
29.800	6.340	1.49	3.049	24590	2.681
29.900	8.670	1.75	3.043	24542	2.713
30.000	11.390	2.02	3.052	24620	2.72
30.100	14.490	2.29	3.062	24699	2.726
30.200	17.980	2.55	3.072	24782	2.732
30.300	21.840	2.81	3.082	24860	2.737
30.400	26.080	3.07	3.092	24942	2.741
30.500	30.680	3.33	3.102	25024	2.745
30.600	35.650	3.58	3.113	25108	2.749
30.700	40.980	3.83	3.123	25193	2.752
30.800	46.670	4.07	3.134	25278	2.754
30.900	52.710	4.32	3.145	25364	2.756
31.000	59.100	4.56	3.156	25455	2.757
31.200	72.930	5.04	3.178	25635	2.756
31.400	88.140	5.52	3.202	25827	2.754
31.600	104.710	5.99	3.226	26024	2.746
31.800	122.610	6.45	3.252	26234	2.736
32.000	141.840	6.91	3.28	26452	2.72

Table 8: Relative energies, forces (AM1/SCF) and vertical transition properties (AM1/MR-CISD with 10 reference occupations and 12 doubly occupied and 12 unoccupied molecular orbitals in the active space) for stretching the C_i conformer of OPV5.

r_{AB} Å	1-C Å	3--4--5 deg	1-C=C deg	6=1-C=C deg	C=C-1'--6' deg	3'--4'-C=C deg	C=C-1'--6'' deg
29.195	1.453	119.4	124.6	19.9	22.2	-22.7	-19.7
29.300	1.454	119.0	125.2	18.0	21.9	-20.9	-17.1
29.400	1.456	118.6	125.8	14.3	20.3	-19.1	-14.4
29.500	1.457	118.2	126.4	11.4	18.6	-17.4	-10.6
29.600	1.459	117.8	126.9	7.8	16.8	-15.0	-7.5
29.700	1.461	117.4	127.4	5.1	13.6	-12.7	-2.1
29.800	1.463	117.0	127.9	5.4	11.7	-10.4	-1.3
29.900	1.465	116.6	128.3	2.7	1.0	2.5	-1.7
30.000	1.468	116.2	128.8	2.4	0.6	1.8	-1.6
30.100	1.470	115.8	129.3	2.3	0.3	1.4	-1.5
30.200	1.472	115.4	129.8	2.0	-0.2	1.1	-1.5
30.300	1.475	115.0	130.2	1.8	-0.4	1.2	-1.4
30.400	1.477	114.6	130.7	1.6	-0.7	1.1	-1.4
30.500	1.480	114.2	131.2	1.5	-1.0	1.1	-1.3
30.600	1.483	113.8	131.6	1.3	-1.3	1.2	-1.3
30.700	1.486	113.4	132.1	1.1	-1.5	1.2	-1.3
30.800	1.488	113.0	132.5	1.0	-1.8	1.2	-1.4
30.900	1.491	112.6	133.0	0.9	-2.1	1.3	-1.4
31.000	1.494	112.3	133.4	0.7	-2.3	1.4	-1.4
31.200	1.501	111.5	134.3	0.5	-2.8	1.5	-1.5
31.400	1.507	110.8	135.1	0.4	-3.3	1.7	-1.6
31.600	1.514	110.1	136.0	0.3	-3.8	2.0	-1.7
31.800	1.521	109.4	136.8	0.3	-4.4	2.3	-1.8
32.000	1.529	108.7	137.5	0.3	-4.9	2.7	-1.9

Table 9: Change of selected structural parameters (bond lengths, bond angles and dihedral angles) on stretching the C_i conformer of OPV5. In the notation for the dihedral angles, –, =, and --denote single, double, and aromatic bonds, respectively.

Excited-state optimizations and fluorescence lifetimes

The geometries of both OPV5 conformers were reoptimized in the first excited singlet state using the same constraints as before for the distance of the outermost ring carbons. The excited state was described by an MR-CI expansion with single and double substitutions relative to ten reference configurations (closed-shell ground-state and nine singly excited configurations involving the orbitals HOMO – 2 through LUMO + 2); the active space included 12 doubly occupied and 12 unoccupied molecular orbitals. Spectral properties were computed at the optimized (nearly planar) excited-state geometries, in particular the radiative lifetime τ (in s) of the first excited state:^[17]

$$\tau = \frac{3}{2f\tilde{\nu}^2}$$

where f is the oscillator strength and $\tilde{\nu}$ is the wavenumber (in cm⁻¹) for emission (fluorescence). Table 10 lists the calculated emission energies,

oscillator strengths, and fluorescence lifetimes of the C_i conformer as a function of the distance, and Figure 11 shows the corresponding graphs for both conformers. The results for the two conformers are again essentially the same, as expected. The computed fluorescence lifetimes show a marked decrease upon elongation which is mostly caused by the increase in the calculated emission energies (see formula above).

Distance r_{AB} Å	Relative Energies kcal/mol	Force nN	Emission Energy		Oscillator Strength f_{rp}	Lifetime ns
			eV	cm ⁻¹		
29.2	0.00	0.00	2.633	21236	2.731	1.218
29.3	0.06	0.15	2.633	21239	2.753	1.208
29.4	0.50	0.45	2.641	21305	2.763	1.196
29.5	1.35	0.74	2.649	21369	2.772	1.185
29.6	2.62	1.02	2.657	21432	2.781	1.174
29.7	4.30	1.31	2.665	21494	2.789	1.164
29.8	6.38	1.58	2.672	21554	2.797	1.154
29.9	8.85	1.86	2.680	21614	2.804	1.145
30.0	11.72	2.12	2.687	21672	2.811	1.136
30.1	14.97	2.39	2.694	21730	2.818	1.127
30.2	18.60	2.65	2.701	21787	2.824	1.119
30.3	22.60	2.91	2.708	21843	2.829	1.111
30.4	26.98	3.17	2.715	21899	2.834	1.104
30.5	31.73	3.43	2.722	21955	2.838	1.097
30.6	36.85	3.68	2.729	22010	2.841	1.09
30.7	42.32	3.93	2.736	22065	2.844	1.083
30.8	48.16	4.18	2.742	22121	2.846	1.077
30.9	54.35	4.43	2.749	22176	2.848	1.071
31.0	60.90	4.67	2.756	22232	2.848	1.066
31.2	75.05	5.16	2.770	22345	2.847	1.055
31.4	90.60	5.64	2.785	22462	2.842	1.046
31.6	107.53	6.12	2.800	22582	2.833	1.038
31.8	125.83	6.59	2.815	22709	2.821	1.031
32.0	145.49	7.06	2.832	22843	2.803	1.025

Table 10: Potential curve, forces, optical properties, and fluorescence lifetimes of the C_i symmetric conformer of OPV5 after geometry optimization in the first excited state (AM1/MR-CISD with 10 reference occupations and 12 doubly occupied and 12 unoccupied molecular orbitals in the active space).

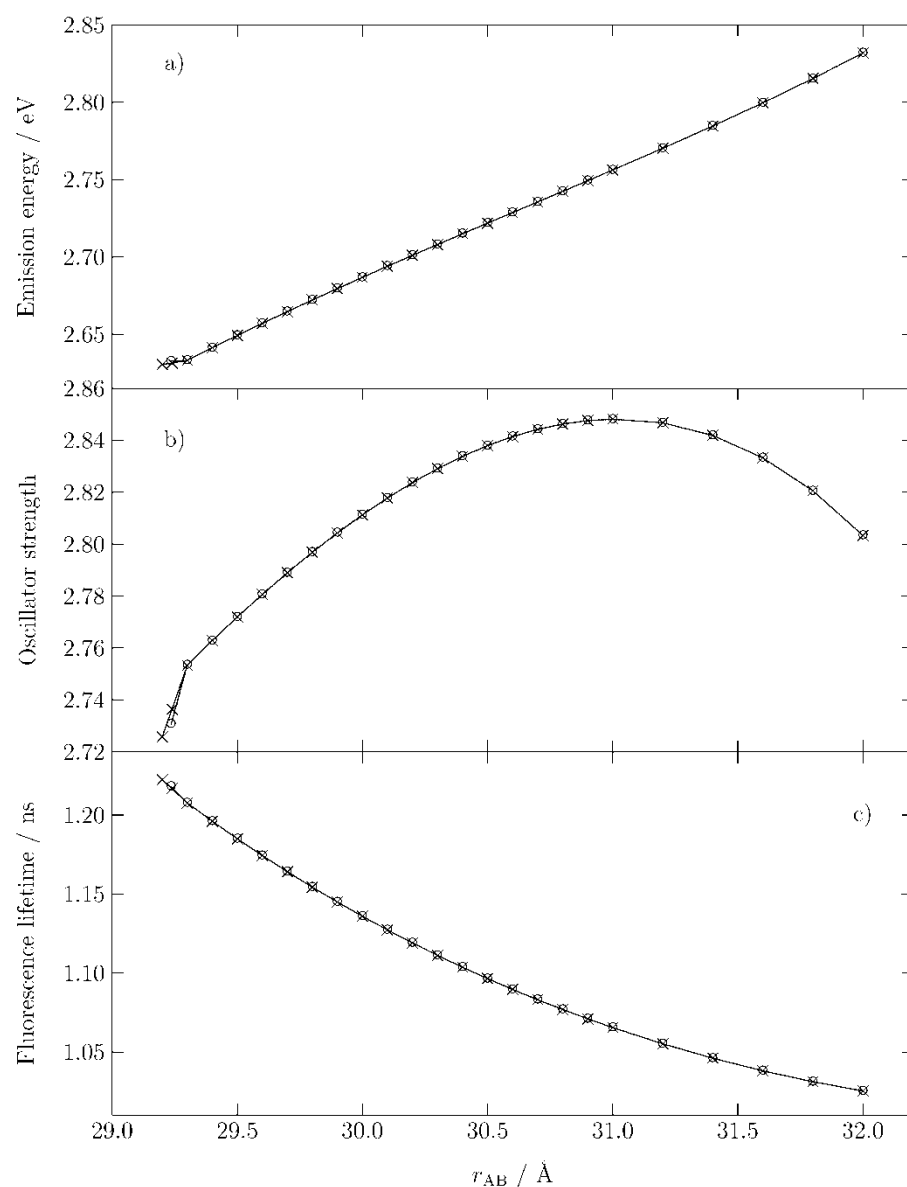


Figure 11: a) Emission energies, b) oscillator strengths, and c) fluorescence lifetimes after geometry optimization in the first excited state of OPV5 for C_2 and C_i symmetry.

- [16] A. Koslowski, M. E. Beck, W. Thiel, *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 714.
- [17] M. Klessinger, J. Michl, *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*, VCH, Weinheim, **1989**.