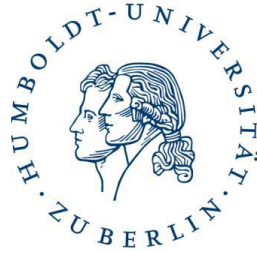


Humboldt-Universität zu Berlin - Institut für Physik Fortgeschrittenen-Praktikum



Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung - Versuchsskript Betreuer: Steffen Hackbarth

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (kurz TCSPC) ist eine statistische Messmethode, mit der strahlende optische Übergänge untersucht werden. Sie soll als Beispiel für Eventbasierte Messverfahren im Mittelpunkt dieses Versuches stehen. Beispielhaft soll das Löslichkeitsverhalten von Phäophorbid a in Ethanol-Wasser Gemischen, sowie die Einbettung in Mizellen untersucht werden. Phäophorbid a ist ein Farbstoff, der zu den Porphyrinen zählt. Die untersuchte Messgröße ist die zeitaufgelöste Fluoreszenz und deren Polarisation.

Die Messmethode selbst, sowie Ihre Optimierung soll kennengelernt werden, um verlässliche Ergebnisse zum Untersuchungsgegenstand zu erzielen.

Stellen Sie sich vor, Ihr(e) Chef(in) gibt Ihnen den Auftrag, eine Messung durchzuführen für die Sie einen TCSPC Messplatz aufbauen müssen.

Dann stehen mehrere Arbeitsschritte für Sie an:

- **Akkumulation von Informationen über die gewünschte Technik und den Untersuchungsgegenstand** – dieser Arbeitsschritt sollte bereits VOR dem Termin im Praktikum erfolgen. Die Literaturliste auf der Webseite zum Versuch stellt dabei nur einen Einstieg dar und erhebt keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit. Nutzen Sie also auch die Bibliothek/das Internet – Sie sollten beim Vortestat zu allen rot gefärbten Begriffen sowie den erwähnten Fragestellungen aussagefähig sein!
- **Aufbau des Messplatzes** – Diese Aufgabe wird Ihnen im Praktikum abgenommen. Alle benötigten Komponenten sind vorhanden und grundsätzlich positioniert.
- **Justage des Aufbaus** – Hier kommen Sie ins Spiel.
- **Einstellen der Arbeitspunkte der verwendeten Komponenten** – Fast immer wird ein maximales **Signal-Rausch-Verhältnis** angestrebt. Die Signalstärke ist ebenfalls ein Parameter, da stärkere Signale kürzere Messungen ermöglichen, aber meist dem SNR nachrangig. Hier sind insbesondere die **PMT-Detektorspannung** und der **Detektionsschwellwert** der TCSPC Elektronik von Interesse – am Versuchstag sollten Sie begründen können, warum.
- **Probenkonditionierung sowie Optimierung der Messparameter** – Neben dem Detektor gibt es weitere am Versuch beteiligte Geräte und Materialien, die gut gewählt sein wollen. Ein offensichtliches Beispiel hierfür ist die Zerstörschwelle von Detektoren, beginnen Sie neue Messungen immer bei geringer Laserleistung. Neben der Laserleistung ist bei diesem Versuch die **optische Dichte** der zu untersuchenden Probe von besonderem Interesse – Warum?
- **Die eigentliche Messung** – Vom Arbeitsaufwand ist das meist der leichteste Teil, aber auch der interessanteste – bereiten Sie Ihre Proben vor und protokollieren Sie gut.

- **Die Auswertung** – Analysieren Sie Ihre Messungen und stellen Sie Ihre Ergebnisse übersichtlich dar (in PRÄSENTATIONSFÄHIGEN Tabellen und Grafiken) – dies sollte IMMER zeitnah erfolgen (auch in Ihrer späteren Forschungstätigkeit, denn irgendwann sollen Sie Ihre Ergebnisse präsentieren und nicht immer ist das Gebiet so schön klein und abgegrenzt wie beim Praktikum)
- **Der nächste Iterationsschritt** – (diesen Teil können Sie beim Praktikum nur bedingt realisieren, aber Sie können aufschreiben, was Sie tun würden) Sie konnten Ihre Ergebnisse mit der Theorie in Übereinstimmung bringen, schön – reproduzieren Sie dies! Es hat (mehrfach) nicht geklappt – versuchen Sie die Ursache zu finden und erweitern Sie Ihre Theorie oder verbessern Sie das Experiment!

Jetzt wird's konkret:

Die AG Photobiophysik beschäftigt sich unter anderem mit Trägersystemen für **Photosensibilisatoren (PS)** in der **Photodynamischen Therapie (PDT)**

Phäophorbid a (Pheo) ist ein guter PS, aber sehr schlecht wasserlöslich und die Anwendungsgebiete der PDT liegen sämtlich in wässriger Umgebung. Irgendwie muss der PS also kontrolliert ins Zielgebiet transportiert werden. Eine einfache mögliche Lösung stellt hierbei die Einbettung des PS in **Mizellen** dar. Ihre Aufgabe besteht nun darin, nachzuweisen, dass die Einbettung in die Mizellen funktioniert und dass der PS in der Mizelle photophysikalisch aktiv bleibt. Als Maß soll die Fluoreszenzintensität und –Abklingzeit genommen werden.

Wie eben beschrieben, steht die eigentliche Messung aber erst am Ende einer Reihe notwendiger Arbeiten, die sicherstellen, dass Sie auch wirklich das messen, was Sie beabsichtigen.

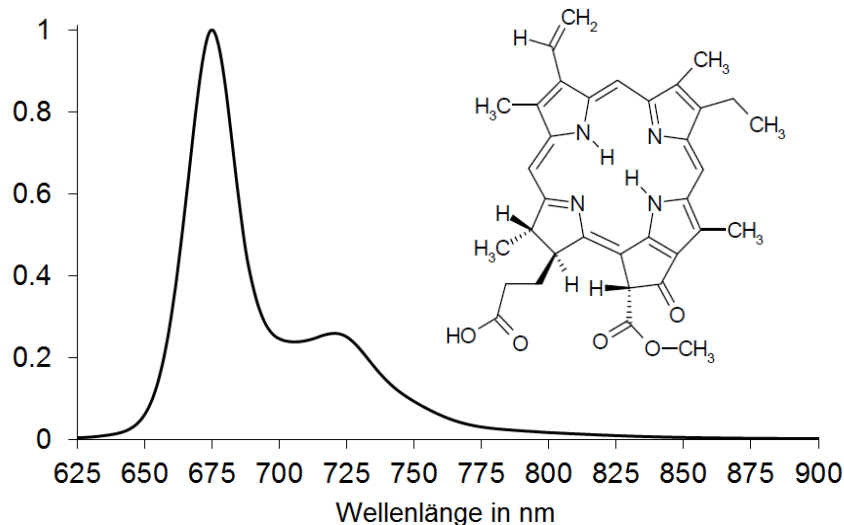


Abbildung 1 Strukturformel und normiertes Spektrum von Pheophorbid a

Warum Einzelphotonenzählung?

Die angestrebte Zeitauflösung einer Fluoreszenzmessung liegt im Pikosekunden-Bereich (10^{-12} s). Die Energie eines Photons im sichtbaren Bereich liegt bei etwa 2 eV, also im Bereich 10^{-19} J. Somit ist man zwar noch drei Größenordnungen von der absoluten Grenze gemäß Unschärferelation entfernt, aber die Tiefpass-Wirkung aller beteiligten Komponenten ist bereits deutlich zu spüren, weswegen analoge Messverfahren versagen. Bei der TCSPC umschiffet man dies, indem die zeitliche Messung von der Intensitätsmessung entkoppelt wird – **weshalb ist dies möglich?**

Aufgaben:

1. Vorbereitung

Setzen Sie sich in Vorbereitung auf den Versuch mit den verwendeten Geräten (deren Aufbau und Funktion) auseinander: (gepulster) Laser, Zeit-Amplituden-Konverter, $\lambda/2$ -Plättchen, Constant Fraction Discriminator, ...

Machen Sie sich Gedanken zu den im Text rot hervorgehobenen Begriffen, wie: Laser, Laser-Moden, Modelocking, Güteschaltung, Einsteinkoeffizienten, Huygens-Fresnell Prinzip, Fourier-Transformation.

Machen Sie sich mit den Grundlagen lumineszierender Stoffe vertraut: Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Jablonski-Diagramm, Löslichkeit, Mizellen, ...

2. Optischer Aufbau und Steuerprogramm

Bereiten Sie den Aufbau für die Messungen vor. Verschaffen Sie sich zunächst einen Überblick über den konkreten Versuchsaufbau, richten Sie die Geräte aus und kontrollieren Sie die Lichtwege. Im Programm erscheint SYNC OK, wenn das Referenzsignal richtig eingestellt ist. Sinusförmige Störungen im Messsignal sind im Allgemeinen auch auf ungünstige Beleuchtung der Referenzdiode zurückzuführen.

Stellen Sie eine Probe mit geringer Pheophobid a-Konzentration (etwa OD 0,1) her. Setzen Sie nun die Küvette in die Halterung ein und stellen Sie die Betriebsspannung des Detektors zunächst auf etwa 0,8V. Machen Sie sich (beispielsweise durch Testmessungen) mit den Einstellungen des Programms vertraut.

Zur Wellenlängenselektion sind zwei Filter vor dem PMT positionierbar. Für alle Streulichtmessungen (Apparatefunktion) nutzen Sie bitte den Graufilter und für alle Messungen an Pheo den (roten) Interferenzfilter 665-675 nm (die Schieberpositionen dafür sind eindeutig markiert).

3. Optimierung eines TCSPC Messplatzes bezüglich PMT Spannung und Detektionsschwellwert

Setzen Sie die am Platz vorhandene Streuküvette (stark verdünntes Ludox) ein und stellen Sie die Detektorspannung auf 800V, sowie die Laserintensität sehr gering, so dass bei Schwellwert 20 mV nicht mehr als 10^6 Photonen detektiert werden. Führen Sie nun Messungen der Apparatefunktion bei CFD-Schwellwerten von 5 – 50 mV durch ohne die anderen Parameter zu verändern.

Vergleichen Sie Signal (der Bereich des Antwortpeaks) und Rauschen (der Bereich zwischen den Peaks und wählen basierend darauf einen sinnvollen Schwellwert

Mit diesem Schwellwert wiederholen Sie den Vorgang für Detektorspannungen zwischen 600 und 1000 V und wählen eine sinnvolle Spannung.

Bestimmen Sie die Parameter, bei denen das Verhältnis zwischen Rauschsignal und relevantem Signal am geringsten ist. Dazu bietet es sich an, den Quotienten aus der Anzahl aller Rauschsignale zu allen relevanten Signalen zu bilden und tabellarisch darzustellen.

Verwenden Sie für alle folgenden Messungen die hier ermittelte optimale Betriebsspannung des Detektors und Schwellwert des CFD, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

4. Apparatefunktion

Nehmen Sie nun eine Apparatekurve mit Hilfe der Streuküvette auf und stellen Sie die letztlich ausgewählte graphisch dar.

Führen Sie diese Messung für mehrere verschiedene Countraten durch und vergleichen Sie die Halbwertsbreiten der Apparatekurven, sowie die auslaufende Flanke. Eine sinnvolle Countrate erkennen Sie daran, dass eine weitere Verringerung der Countrate die Apparatefunktion nicht schmaler werden lässt.

Sie brauchen in jedem Datenfile einen Messblock, der die Apparatefunktion enthält für die Auswertung (idealerweise BLOCK 1) für die spätere Auswertung.

Wenn Sie am Anfang die Apparatefunktion einmal im Block 1 aufgenommen haben, können Sie diese dort belassen und immer mit abspeichern. Normalerweise sollte man sie immer neu bestimmen, aber hier sind die Schwankungen sehr gering.

5. Versuchsparameter

Optimieren Sie die Messparameter (Anregungsintensität/Countrate, OD der Probe), um Messfehler zu vermeiden (**Peak Pile-Up** bzw. **Reabsorption**)

5.1. Peak-Pile-Up-Effekt

Setzen Sie eine Probe Pheo in den Messplatz ein ($OD < 0,2$) und führen Sie Messungen mit verschiedenen Intensitäten des Laserpulses/Countraten durch (die CFD-Countrate darf bei dieser Teilaufgabe ruhig bis 10^7 gehen). Stellen Sie Ihr Ergebnis graphisch und tabellarisch dar und wählen Sie eine sinnvolle Einstellung für die weitere Messung. Diskutieren Sie die χ^2 Werte in Abhängigkeit der Intensität und wählen Sie eine geeignete Intensität für die nachfolgenden Messungen. Diskutieren Sie im Hinblick auf den Pile-Up Effekt die Verteilung der Residuen!

5.2. Reabsorption

Stellen Sie mindestens 5 Proben mit verschiedenen verschiedenen Konzentrationen an Pheo her, so dass die optische Dichte zwischen 0,1 und 1,5 liegt.

Messen Sie die Fluoreszenzlebensdauer für diese Proben. Stellen Sie Ihr Ergebnis graphisch und tabellarisch dar und ziehen Sie Schlüsse für die Probenkonditionierung.

6. Fluoreszenzlebensdauer (Basiswert)

Messen Sie die Fluoreszenzlebensdauer von Pheo bei optimalen Einstellungen und stellen Sie Ihr Ergebnis, sowie die Residuen des Fits graphisch dar. Bewerten Sie die Messung.

7. Pheophorbid a in Ethanol-Wasser-Gemischen

Stellen Sie mindestens 5 Proben gleicher Konzentration an Pheophorbid a her, bei denen sich aber das Verhältnis von Ethanol zu Wasser unterscheidet. Die stärksten Effekte sind für Wasseranteile im Bereich oberhalb 50% zu erwarten. Eine Probe sollte möglichst viel Wasser enthalten. Vergleichen Sie die Ergebnisse mit einer passenden Ethanol Probe.

Führen Sie für jede dieser Proben eine Messung durch und stellen Sie diese graphisch dar. Diskutieren und interpretieren Sie die Änderungen der Messergebnisse bei zunehmendem Wasseranteil.

8. Triton X-100

Triton X-100 ist ein Detergenz, welches Pheophorbid in Mizellen einbettet und so wasserlöslich macht. Geben Sie 2 Tropfen der 10%igen Stammlösung des Triton X-100 in die Probe aus 7. mit höchstmöglichem Wasseranteil und führen Sie die Messungen erneut durch. Stellen Sie Ihre Ergebnisse graphisch dar und vergleichen Sie sie mit denen aus 7.

Gehen Sie in der Auswertung auf die Wirkungsweise von Triton X-100 ein und erklären Sie, warum das Pheophorbid a wieder fluoresziert.

9. Weisen Sie die Einbettung des Pheo in die Mizellen nach

Vergleichen Sie dazu das Abklingen der Anisotropie von Pheo in Ethanol mit Pheo in Wasser/Triton. - Drehen Sie dafür den Polarisationsfilter hinter der Küvette nacheinander in die senkrechte Position (d.h. die detektierten Photonen sind parallel zu den eingehenden polarisiert und in die waagerechte Position (d.h. die detektierten Photonen sind senkrecht zu den eingehenden polarisiert) und führen Sie die Messung durch.

Berechnen Sie die zeitaufgelöste Anisotropie und stellen sie alle Ergebnisse graphisch dar.

Vergleichen Sie die Verläufe für Pheophorbid a in Ethanol und in Ethanol/Wasser mit Triton X-100. Diskutieren und interpretieren Sie die Unterschiede der beiden Verläufe.

Um Sie bei Ihrer Informationssuche etwas zu unterstützen, sollen hier ein paar einleitende Worte folgen, auch um die zu erklärenden Begriffe im Kontext zu benennen. Weiteres Informationsmaterial, zum PS, Laser, zur TCSPC und zu Photomultipliern finden Sie auf der Webseite zum Versuch (user: fpr, pw: laser50).

Aufbau und Prinzip der TCSPC

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

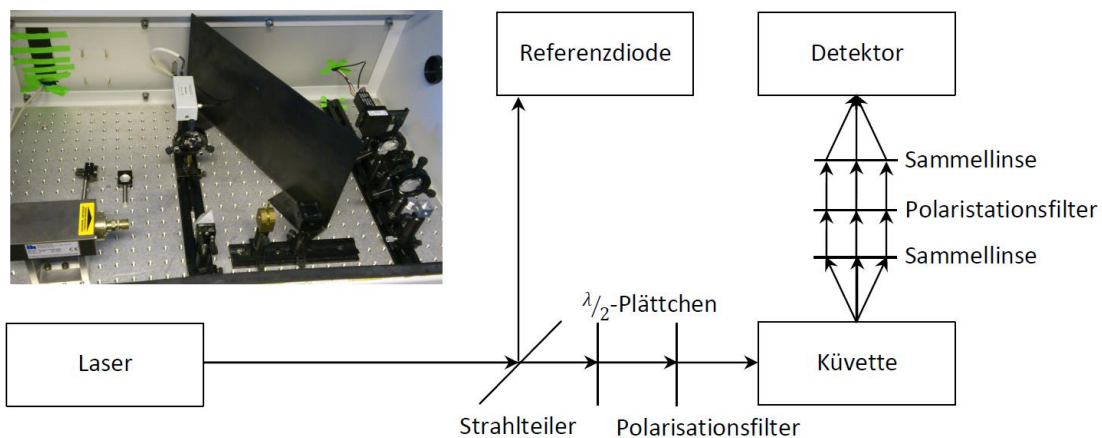


Abbildung 2 Messaufbau

Der **Laser** emittiert einen gepulsten Laserstrahl, der auf einen halbdurchlässigen Spiegel trifft. Dieser teilt den Strahlenweg in zwei Komponenten. Der eine trifft auf eine Referenzdiode. Der andere wird mit Hilfe eines **$\lambda/2$ -Plättchens** und eines vertikal orientierten Polarisationsfilters abgeschwächt und trifft anschließend auf die Probe.

Wird also ein Puls vom Laser emittiert, trifft ein Teil dieses Pulses auf die Referenzdiode, welche die Zeitmessung startet. Der andere Teil des Pulses trifft abgeschwächt auf die Küvette, in der sich der fluoreszierende Stoff befindet. Wechselwirkt nun ein Photon des Pulses mit einem Fluorophor, so wird dieses angeregt. Bei der Rückkehr in den Grundzustand emittiert dieses Fluorophor dann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ein Photon, welches auf den Detektor treffen kann und die Messung durch ein Schaltsignal beendet. Bei dem Detektor handelt es sich um einen **Photomultiplier** dessen Pulse einen **Constant Fraction Discriminator** passieren müssen, um gemessen zu werden.

Für die Elektronik ist es nun aber günstiger, die Messung mit dem Detektorpuls zu starten (**inverse TCSPC**), da zur Vermeidung des **Pile-Up Effektes** nur etwa alle 100 Pulse überhaupt ein Photon detektiert werden kann. Würde das Signal Referenzdiode als Startsignal verwendet werden, müsste die Elektronik bei jedem Puls eine neue Messung starten. Davon würden aber viele abgebrochen werden, weil kein Photon detektiert werden könnte. Das Starten der Messung am Detektor stellt hingegen sicher, dass jede begonnene Messung auch zu Ende geführt wird. Die Referenzdiode beendet dann die Messung und

liefert zusammen mit der Pulsfrequenz des Lasers die Startzeit des zum detektierten Photon gehörigen Laserpulses. Ausserdem verursacht jede Messung immer eine gewisse Totzeit, ein Zeitraum, in dem der Detektor quasi „blind“ ist, was die Messung unnötig verlängern würde.

Fluoreszenz

Lumineszenz bezeichnet allgemein die Emission von Photonen aus einem elektrisch angeregten Zustand. Je nach Art des Anregungszustandes unterscheidet man zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Um den Unterschied zu verstehen, sollen zwei Elektronen eines Systems (beispielsweise eines Atoms) betrachtet werden.

Liegen zwei Elektronen im gleichen elektrischen Zustand vor, so müssen sie sich nach dem Pauli-Prinzip in ihrem Spin-Zustand unterscheiden. Eines der Elektronen ist also im Spin-Up-Zustand das andere im Spin-Down-Zustand. Die Summe der Spinquantenzahlen der beiden Elektronen ist somit null und man bezeichnet die Elektronen als gepaart. Liegen auch ungepaarte Elektronen vor, die prinzipiell im Spin-Up- oder Spin-Down-Zustand vorliegen können, so muss die Summe der Spinquantenzahlen nicht mehr null ergeben. Ein Maß für die Summe aller Spinquantenzahlen eines Systems ist die Multiplizität $M=2|S|+1$. Liegen also z.B. nur gepaarte Elektronen vor, so ergibt sich die Multiplizität zu 1 und man spricht vom sogenannten Singulett-Zustand. Ergibt sich die Summe der Spinquantenzahlen hingegen zu 1, so ist die Multiplizität 3 und man spricht vom Triplett-Zustand. Den Unterschied zwischen Singulett- und Triplett-Zustand kann man beispielsweise in der Spektroskopie sehen, bei Aufhebung der Entartung (z.B. im Magnetfeld). Hier entspricht die Anzahl der sichtbaren Spektrallinien gerade der Multiplizität, d.h. bei einem Singulett-Zustand sieht man eine Linie, bei einem Triplett-Zustand hingegen drei Linien.

Das Jablonski Diagramm

Jedes Elektron des Systems liegt auf einem bestimmten Energieniveau in einem bestimmten Schwingungszustand. Für ein Energieniveau-Schema ist dabei zu beachten, dass die Energiedifferenzen zwischen verschiedenen Energieniveaus deutlich größer sind als die Energiedifferenzen zwischen den Schwingungszuständen. Wird nun ein Elektron aus seinem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau in einen bestimmten Schwingungszustand angeregt, so wird es unter Wärmeabgabe innerhalb von wenigen Pikosekunden in den energieärmsten Schwingungszustand des Energieniveaus wechseln. Die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei Zuständen gleicher Multiplizität ist antiproportional zur $(\Delta E)^3$.

Der energetische Abstand der Schwingungsniveaus eines angeregten Zustandes nimmt mit zunehmender Energie ab (die Parabelnäherung der Molekül Potentialkurven über der Generalisierten Kernkoordinate - gilt nur bei kleinen Werten). Somit weisen die höheren Schwingungsniveaus des nächst tieferen Zustandes eine deutlich höhere Zustandsdichte auf, als die untersten Schwingungsniveaus des derzeit besetzten Zustandes. Nach **Fermis Goldener Regel** ist somit ein Übergang sehr wahrscheinlich.

Diese gerade beschriebenen strahlungsfreien Übergänge nennt man **Internal Conversion**.

Allgemein werden die energetischen Abstände sowohl der Energieniveaus, als auch der dazugehörigen Schwingungsniveaus mit abnehmender Anregungsenergie größer, womit die Übergänge auch langsamer werden. Der langsamste Übergang ist konsequenterweise der aus dem schwingungsfreien S1 Zustand nach S0. Die Lebensdauer dieses Zustandes kann mehrere Nanosekunden betragen. Dadurch sind andere Prozesse, als die interne Konversion im Prinzip nur aus diesem Zustand möglich (**Regel von Kasha**). Dazu zählen die **Fluoreszenz**, intermolekularer Energie- und Elektronentransfer bzw. das **Intersystem Crossing**.

Die Lebensdauer dieses Zustandes ist somit für die Beschreibung der Eigenschaften eines Farbstoffes von entscheidender Bedeutung, da sie der Ausgangspunkt für alle nachgeordneten Prozesse ist. Zu ihrer Messung eignet sich die Fluoreszenz besonders gut, da sie ein natürlicher Vorgang ist und ihre Beobachtung die beteiligten Moleküle nicht beeinflusst. Es sei an dieser Stelle aber noch darauf hingewiesen, dass die **Abklingzeit der Fluoreszenz** (und somit der S1 Besetzung) durch verschiedene Prozesse beeinflusst wird. Die Fluoreszenz mit der dazugehörigen „**natürlichen Lebensdauer**“ ist nur ein Entleerungskanal. Die tatsächliche

experimentelle Lebensdauer ergibt sich aber als Reziprok der Summe aller beteiligten Ratenkonstanten.

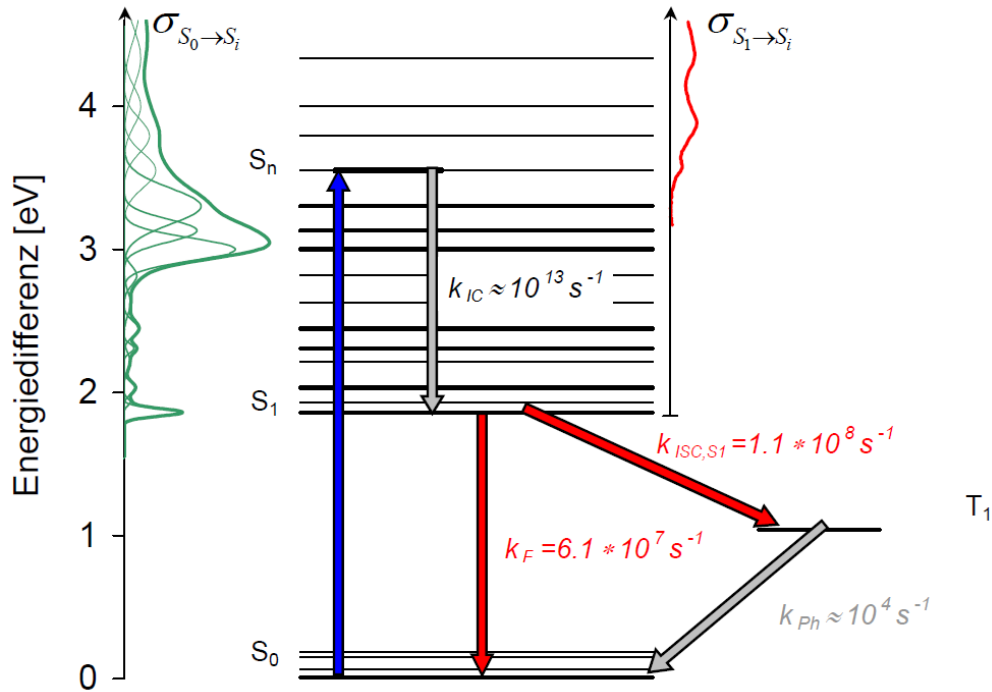


Abbildung 3 Jablonski-Diagramm von Pheophorbid a in Ethanol. – Eindimensionales Energieschema zur Veranschaulichung aller Zustände und der Übergänge dazwischen. Die dazugehörigen Absorptionsspektren aus dem S_0 und S_1 Zustand sind zum besseren Verständnis mit eingezeichnet.

Obwohl grundsätzlich verboten, kann sich unter bestimmten Voraussetzungen (starke **Spin-Bahn-Kopplung** im Falle zyklischer **konjugierter Pi-Elektronensysteme** oder bei **Schweratomeffekt**) auch der Spin-Zustand des Elektrons während des strahlungsfreien Übergangs ändern. Es geht also von einem Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand über (**Intersystem Crossing**). Das Elektron kann nun nicht mehr einfach in den Grundzustand wechseln, da sich dort bereits ein Elektron im gleichen Spin-Zustand befindet. Neben der Abgabe eines Photons muss sich also auch der Spin-Zustand des Elektrons wieder ändern. Dieser Prozess wird dann Phosphoreszenz genannt. Im Vergleich zur Fluoreszenz ist die Übergangsrate viel geringer und die Lebensdauer der angeregten Zustände viel höher.

Quantenausbeute

Im dargestellten Zusammenhang ist die sogenannte Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_{Fl} eine interessante Größe. Sie beschreibt, wie groß der Anteil der von einem Stoff emittierten Photonen zu den von ihm absorbierten Photonen ist. Aufgrund strahlungsfreier Übergänge ist die Anzahl der emittierten Photonen kleiner als die Anzahl der absorbierten und die Quantenausbeute somit kleiner als eins. Sei k_{Fl} die Übergangsrate strahlender Übergänge und k_{sonst} die Übergangsrate strahlungsfreier Übergänge, dann gilt:

$$\Phi_{\text{Fl}} = \frac{k_{\text{Fl}}}{k_{\text{Fl}} + k_{\text{sonst}}} \quad (1.1)$$

Konsequenterweise lässt sich also bei Kenntnis der Fluoreszenzquantenausbeute die natürliche Lebensdauer aus der gemessenen Fluoreszenz-Abklingzeit errechnen.

Anisotropie eines Fluorophors

Fluorophore haben die Eigenschaft, bevorzugt elektromagnetische Strahlung entsprechend ihres Übergangsdipolmoments zu absorbieren bzw. emittieren. Dabei ist das Übergangsdipolmoment des Fluorophors eine vektorielle Größe, dessen Richtung gerade die Polarisationsrichtung des Lichts beschreibt, bei der der Stoff bevorzugt absorbiert bzw. emittiert.

Der fluoreszierende Stoff nun in der Regel in Form einer isotropen Lösung vorliegt, sind die Übergangsdipolmomente entsprechend der Boltzmann-Verteilung zufällig orientiert. Die Anisotropie wird erst durch die Anregung mit einem linear polarisierten Laserpuls geschaffen. Bevorzugt werden solche Moleküle absorbieren, bei denen der Winkel zwischen Polarisierung des Anregungslichtes und Übergangsdipolmoment klein ist. Da Absorptions- und Emissionsdipolmoment eines Moleküls einen festen Winkel besitzen, führt dies im Allgemeinen auch zu polarisierter Fluoreszenz. Die Fluoreszenz Anisotropie r errechnet sich nach:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1.2)$$

, wobei im Allgemeinen noch berücksichtigt werden muss, dass die Detektionsempfindlichkeit polarisationsabhängig sein kann (in unserem Fall ist diese Abhängigkeit jedoch vernachlässigbar - überlegen Sie, warum?)

Da sich die Fluorophore nun in der Lösung bewegen, sich insbesondere drehen, nähert sich die Probe jedoch nach und nach wieder einer isotropen an. Das zeitliche Verhalten hängt dabei stark von der Form des untersuchten Farbstoffes und seiner Umgebung ab. Im Falle eines sphärischen Moleküls würde die Anisotropie einfach exponentiell abfallen.

$$r = (r_0 - r_{\infty}) \cdot e^{-t/\tau_{\text{Rot}}} + r_{\infty} \quad (1.3)$$

,wobei die Rotationsabklingzeit τ_{Rot} maßgeblich durch die Molekülgröße und die Umgebung bestimmt wird. Eine Restanisotropie tritt immer dann auf, wenn die Rotation des Moleküls durch Ankopplung oder Einbettung in einen sehr großen Träger behindert wird.

$$\tau_{\text{Rot}} = \frac{\eta V}{k_B T} \quad (1.4)$$

Dabei ist η die Viskosität, V das Volumen des Moleküls, k_B die Boltzmannkonstante und T die Temperatur.

Eine wesentliche Schlussfolgerung ist, dass Messungen, bei denen der Einfluss der Molekülrotation nicht die Messergebnisse beeinflussen soll (z.B. Fluoreszenz Abklingzeiten) eine sinnvolle Positionierung des Beobachtungs-Polarisationsfilters erfordern. Wie sieht diese aus und warum (Stichwort: „Magischer Winkel“)?