

FLUORESZENZ BASIERTE METHODEN
UND NEUE FLUORESZENZ-FARBSTOFFE
ZUM NACHWEIS VON ANALYTEN IN LÖSUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Dipl. Chem. René J. Püschl
geb. am 06.12.1968 in Heinsberg

eingereicht beim Fachbereich Chemie

der Universität Siegen

Siegen 2005

urn:nbn:de:hbz:467-1120

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2005

Vorsitzender: PD Dr. Christoph Zander

Beisitzer: Prof. Dr. Bernd W. Wenclawiak

PD Dr. Erwin Thiel

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die seit Jahrzehnten etablierte Kapillarelektrophorese mit der relativ jungen Methode der Einzelmoleküldetektion kombiniert. Das Ziel, Analytgemische auf Einzelmolekül-Ebene elektrophoretisch aufzutrennen und zu detektieren, konnte durch den Einsatz geeigneter, geladener Fluoreszenzfarbstoffe erreicht werden. Als experimenteller Aufbau wurde dabei ein konfokales Mikroskop eingesetzt, als Anregungslichtquelle wurde eine Laserdiode verwendet. Die registrierte Fluoreszenz der Farbstoffe wurde dabei über die zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung ausgewertet. Unter Zuhilfenahme der Kapillarelektrophorese konnten im Verlauf dieser Arbeit unterschiedliche Proben, die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffmoleküle als Analyten enthielten, anhand ihrer Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dabei war die erreichte Empfindlichkeit der Apparatur so hoch, dass selbst einzelne Analytmoleküle nachgewiesen und anhand ihrer Fluoreszenzabklingdauer identifiziert werden konnten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue öllösliche Fluoreszenzfarbstoffe und -konzentrate zu entwickeln. In der Farbstoffklasse der Pyrromethene wurde eine Substanzgruppe gefunden, die durch Modifikation der Edukte zu einer sehr hohen Öllöslichkeit des Produkts führt. Neben der Darstellung höchst öllöslicher Fluoreszenzfarbstoff konnten ebenso Konzentrate auf Pyrromethen-Basis entwickelt werden. Diese Konzentrate wurden dabei so hoch konzentriert, dass deren Fluoreszenz noch bei einer Verdünnung um einen Faktor 2000 mit bloßem Auge zu erkennen waren.

Für einen eventuellen kommerziellen Einsatz wurde die Synthese so optimiert, dass die Farbstoffe ohne Isolierung der Zwischenstufen hergestellt werden können.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Pyrrol-Derivaten konnte gezeigt werden, dass eine große Anzahl an Fluoreszenzfarbstoffen durch die Pyrromethene zu erschließen sind.

Abstract

In the thesis at hand a combination of capillary electrophoresis with the technique of single molecule detection is studied. In that context separation of different analyte molecules could be demonstrated on the single molecule level by using charged analyte molecules. Moreover different analytes solved in a single sample were identified by their migration time as well as by their fluorescence decay time. For this purpose fluorescent dyes were used as analyte molecules. The optical set-up based on a confocal microscope with a laser diode as excitation source. To determine the fluorescence decay time of the analyte molecules the technique of time-correlated single-photon counting was used. The achieved sensitivity of the entire set-up was high enough to detect and identify even individual molecules.

In the second part of this thesis new highly oil soluble fluorescent dyes and concentrates were developed. The achieved solubility of the new fluorescent concentrates was as high, that the fluorescence of a 2,000 times diluted sample could be seen with the naked eye. For commercial purposes an optimized process could be designed so that the new compounds could be synthesized in a single vessel.

für
Jonas, Sarah
und Anke

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in mehrjähriger Arbeit an der Universität Siegen im Fach Physikalische Chemie unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Christoph Zander durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die interessante Thematik und die finanzielle Unterstützung. Darüber hinaus möchte ich Herrn Zander für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und seine stete Diskussionsbereitschaft danken.

Meinen ehemaligen Kollegen R. Bornemann und I. Gregor danke ich für die freundschaftliche und angenehme Zusammenarbeit. Herrn Priv.-Doz. Dr. Erwin Thiel möchte ich danken, dass er mir im „Zentrum für Sensorsysteme“, ZESS der Universität Siegen für viele Untersuchungen Unterkunft gewährt hat.

Mein Dank gilt auch den Herren Meyer, Gaumann und Neumann aus der feinmechanischen und Herrn P. Rickert aus der elektronischen Werkstatt für die gewissenhafte Anfertigung von Gerätschaften.

Dem Graduiertenkolleg „Chemische Reaktion und molekulare Ordnung“ und der VW-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Für die Überlassung von Farbstoffproben bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.H. Drexhage und Frau Dr. J. Arden-Jacob.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Wenclawiak, der mich im Rahmen des „Center for Nanochemie“, C_μ der Universität Siegen finanziell unterstützte und mir die Gelegenheit gab, mich in die interessante und zukunftssträchtige Technologie „Lab-on-Chip“ einzuarbeiten. Auch möchte ich mich bei den Mitgliedern in der Arbeitsgruppe um Herrn Wenclawiak für deren freundliche Aufnahme bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Anke, die mich mit viel Geduld und noch mehr Ausdauer begleitet hat.

Sobald jemand in einer Sache Meister geworden ist,
sollte er in einer neuen Sache Schüler werden.

Gerhart Hauptmann

| | | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Allgemeines..... | 1 |
| 1.2 | Zielsetzung | 2 |
| 1.3 | Fluoreszenz als Nachweismethode..... | 3 |
| 1.3.1 | Detektoren und Instrumente für den Nachweis von Fluoreszenz..... | 5 |
| 2 | Nachweis einzelner Analytmoleküle in Lösung..... | 8 |
| 2.1 | Allgemeines..... | 8 |
| 2.2 | Probleme bei der Detektion einzelner Moleküle..... | 8 |
| 2.3 | Komponenten zum experimentellen Nachweis einzelner Moleküle..... | 9 |
| 2.3.1 | Lichtquellen für eine konfokale Anregung | 9 |
| 2.3.2 | Emissionswellenlänge des Diodenlasers | 10 |
| 2.3.3 | Ermittlung der Fokus-Dimensionen des experimentellen Aufbaus | 13 |
| 2.3.4 | Optische Filtersysteme zur Unterdrückung von Fremdlicht | 15 |
| 2.3.5 | Anordnung des Probevolumens | 16 |
| 2.3.6 | Anforderungen an die Analytmoleküle | 17 |
| 2.4 | Methodik zur Identifizierung einzelner Moleküle..... | 17 |
| 2.4.1 | Das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen..... | 17 |
| 2.4.2 | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie | 20 |
| 2.5 | Detektion individueller Analytmoleküle in Lösung..... | 23 |
| 2.5.1 | Konzentration der Analytmoleküle | 23 |
| 2.5.2 | Reinheit des Lösungsmittels für Messungen auf Einzelmolekül-Niveau | 25 |
| 2.6 | Zusammenfassung..... | 27 |
| 3 | Elektrophorese als Trennmethode unterschiedlicher Analyten einer Probe | 28 |
| 3.1 | Allgemeines..... | 28 |
| 3.2 | Elektrophoretische Verfahren..... | 28 |
| 3.2.1 | Allgemeines..... | 28 |
| 3.2.2 | Kapillarelektrophorese | 31 |
| 3.2.2.1 | Allgemeines..... | 31 |
| 3.2.2.2 | Physiko-chemische Effekte in Kapillaren | 33 |
| 3.2.2.3 | Injektionsmethoden von Analytmolekülen | 37 |
| 3.3 | Detektion individueller Moleküle in Kapillaren | 38 |
| 3.3.1 | Allgemeines..... | 38 |
| 3.3.2 | Experimente zur Auftrennung und Detektion individueller Moleküle unter Zuhilfenahme der Elektrophorese in Kapillaren | 38 |

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.3 | Migrationsgeschwindigkeit | 40 |
| 3.3.4 | Kapillarelektrophoretische Probenauftrennung..... | 42 |
| 3.4 | Zusammenfassung | 47 |
| 4 | Anwendungen fluoreszenzbasierter Methoden in der Tribologie | 48 |
| 4.1 | Probleme in der Tribologie..... | 48 |
| 4.2 | Strategie zur Entwicklung öllöslicher Fluoreszenzfarbstoffe | 49 |
| 4.2.1 | Löslichkeit von Pyrromethen-Farbstoffen in verschiedenen Lösungsmitteln und Mineralölen | 50 |
| 4.2.2 | Farbstoffkonzentrate..... | 53 |
| 4.2.3 | Synthese von Pyrromethen..... | 55 |
| 4.2.3.1 | Synthesevorschrift von Pyrromethen 567 | 56 |
| 4.2.3.2 | Modifizierte Pyrromethen-Synthese | 56 |
| 4.2.3.3 | Allgemeine Einstufen-Synthese der modifizierten Pyrromethene | 57 |
| 4.2.3.4 | Reinigung der Produkte..... | 58 |
| 4.2.4 | Synthese neuer Pyrromethen-Farbstoffe | 59 |
| 4.2.4.1 | Variationen der Edukte..... | 60 |
| 4.2.4.2 | Eigenschaften der neuen Pyrromethen-Farbstoffe | 62 |
| 4.3 | Zusammenfassung | 67 |
| 5 | Liste der Abkürzungen | 68 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 69 |
| 7 | Anhang | 74 |
| 7.1 | Spektren der eingesetzten Filter | 74 |
| 7.1.1 | Anregungsfilter..... | 74 |
| 7.1.2 | Fluoreszenzfilter..... | 74 |
| 7.1.3 | Bandpassfilter | 75 |
| 7.1.4 | Kombination Fluoreszenzfilter – Bandpassfilter..... | 75 |
| 8 | Strukturen und spektrale Daten | 76 |
| 8.1 | Farbstoffe der Elektrophorese-Experimente | 76 |
| 8.1.1 | HIDCI: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanin Iodid..... | 76 |
| 8.1.2 | JA22E | 77 |
| 8.1.3 | JA33 | 79 |
| 8.1.4 | JA34 | 80 |
| 8.2 | Pyrromethen-Farbstoffe | 83 |
| 8.2.1 | Pyrromethen 567 | 83 |

| | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.2.2 | Vorprodukt zu Pyrromethen 567 | 84 |
| 8.2.3 | Butylpyrromethen 567 | 84 |
| 8.2.4 | Pentylpyrromethen 567 | 86 |
| 8.2.5 | Hexylpyrromethen 567 | 88 |
| 8.2.6 | Heptylpyrromethen 567 | 90 |
| 8.2.7 | Pyrromethen 546 | 92 |
| 8.2.8 | Heptylpyrromethen 546 | 93 |
| 8.2.9 | Dipyrromethen 546 | 95 |
| 8.2.10 | Pyrrolpyrromethen | 97 |
| 8.2.11 | Indolpyrromethen | 98 |
| 8.3 | Referenzfarbstoffe zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute | 99 |
| 8.3.1 | Fluorescein | 99 |
| 8.3.2 | Rhodamin 6G | 100 |
| 9 | IUPAC-Namen | 101 |
| 10 | VbF – Verordnung über brennbare Flüssigkeiten | 104 |

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Schon seit Urzeiten bestaunen Menschen Chemoluminenszenzphänomene in der Natur. Insbesondere die Biolumineszenz, ein Sonderfall der Chemolumineszenz, ist als das kalte Leuchten von Pilzen, Tiefseefischen und Leuchtkäfern bekannt und seit etwa 3500 Jahren dokumentiert [1]. Dabei kann die Lichterscheinung im ultravioletten, sichtbaren oder IR-Bereich des Spektrums liegen. Bei der Chemolumineszenz reagieren zwei oder mehr Komponenten miteinander, wobei eine Komponente in einen elektronisch angeregten Zustand übergeht und die Energie in Form von Licht wieder abgibt.

Eine andere natürliche Leuchterscheinung ist die Fluoreszenz, die Sir George Gabriel Stokes (1819–1903) erstmalig im Jahre 1852 beschrieb. Bei seinen Beschreibungen stützte er sich auf Experimente mit Fluorid (CaF_2), bei denen ultraviolettes Licht absorbiert und blaues Licht emittiert wird [2]. Eine populäre Anwendung von Fluoreszenz liegt beispielsweise in der Einarbeitung von fluoreszierenden Substanzen in Kleidungsstücken, um die Sicherheit des Trägers zu erhöhen. Bei Wertpapieren und Geldscheinen werden heute Fluoreszenzfarbstoffe zur Erhöhung der Fälschungssicherheit eingebettet. In früheren Zeiten wurden Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Rhodamin B) in Kosmetika eingesetzt [3], aber auch in der Druckfarbenindustrie kamen Farbstoffe zur Einfärbung von Papier zum Einsatz (z. B. Rhodamin 6G) [4].

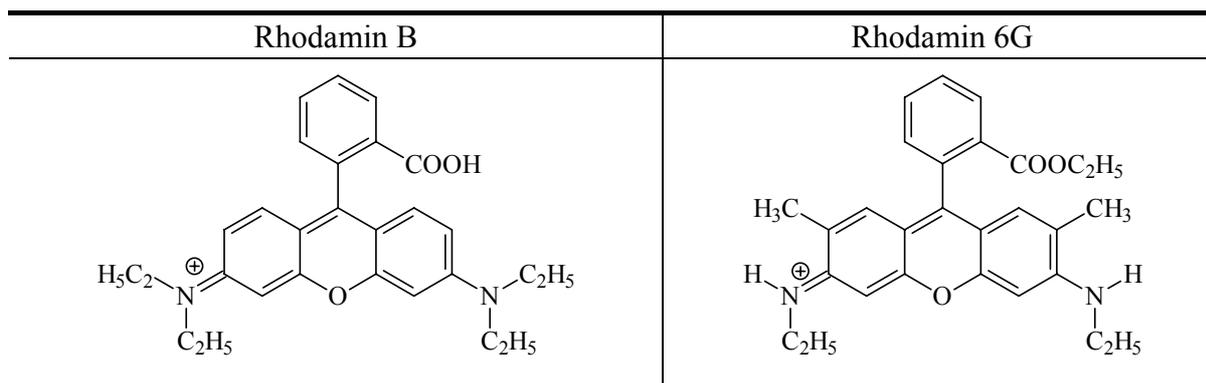


Abbildung 1: Strukturen von Rhodamin B und Rhodamin 6G

Neben diesen Einsatzbereichen basieren verschiedene Technologien auf fluoreszierenden Materialien. So wurde z. B. zur Steigerung des Wirkungsgrades bei der Energiegewinnung mittels Sonnenenergie vorgeschlagen, Fluoreszenz-Solarkollektoren einzusetzen. Der Vorteil solcher Systeme wurde darin gesehen, dass diese in der Lage seien, auch diffuse Sonnenstrahlung zu konzentrieren und sollten daher für die Gewinnung von Solarenergie in

nördlichen Breiten besonders geeignet sein [5, 6, 7]. In einer analogen Anwendung werden in der Physik spezielle Fluoreszenzfarbstoffe als Wellenlängen-Shifter in Szintillations-Detektoren eingesetzt, um die emittierte Strahlung an die Wellenlängenempfindlichkeit des Detektors anzupassen.

Ein Anwendungsgebiet von steigender Bedeutung für auf Fluoreszenz basierende Methoden ist der Nachweis von Substanzen. Insbesondere in der Biologie wird zunehmend die hohe Empfindlichkeit von Fluoreszenzsystemen genutzt. Hier reicht der Einsatz von der Durchfluss-Cytometrie [8, 9, 10] bis hin zu immunologischen Tests [11, 12]. Neben dem reinen Nachweis von Analyten liefert die Fluoreszenzmikroskopie zu dem äußerst anschauliche, bildhafte Darstellungen von Kompartimenten in pflanzlichen und tierischen Zellen.

1.2 Zielsetzung

Die Kapillarelektrophorese ist seit Jahrzehnten ein etabliertes Analyseverfahren zur Trennung unterschiedlicher Moleküle im elektrischen Feld, das durch Einsatz moderner Detektionsmethoden stets empfindlicher geworden ist. Andererseits repräsentiert die auf Fluoreszenz basierende Einzelmoleküldetektion mit ihrer ultimativen Empfindlichkeit eine besonders interessante Detektionsmethode zum Nachweis von Analyten in Lösung. Inspiriert durch diese Techniken ist ein Ziel dieser Arbeit, die beiden Verfahren miteinander zu kombinieren und eine Auftrennung von Fluoreszenzfarbstoffgemischen auf Einzelmolekül-Niveau mittels Kapillarelektrophorese zu realisieren. Dabei sollte zur effektiveren Auftrennung und Detektion der Analyten die Kapillarelektrophorese mit all ihren Vorteilen verwendet werden. Zur Identifizierung der unterschiedlichen Analytmoleküle ist vorgesehen, neben der Migrationszeit die zeitkorrelierte Einzelphotonen-Zählung einzusetzen.

Neben dem Einsatz von Fluoreszenz als Hilfsmittel zur höchstempfindlichen Detektion im Bereich der Analytik können auf Fluoreszenz basierende Techniken auch eingesetzt werden, um Substanzen schnell, einfach und empfindlich nachzuweisen. Dies ist insbesondere interessant im Bereich technischer Anwendungen, wie der Tribologie oder Hydraulik. Um die Möglichkeiten auf diesem Sektor zu untersuchen, umfasst ein weiteres Themengebiet dieser Arbeit die Synthese neuer, öllöslicher Fluoreszenzfarbstoffe. Im Mittelpunkt steht hier die Entwicklung von Farbstoffkonzentraten, die besonders den Anforderungen der Tribologie und Hydraulik entsprechen. Dabei sei angemerkt, dass heute in der Regel ein zentrales Anliegen bei der Entwicklung neuer Fluoreszenzfarbstoffe deren Anwendbarkeit in biologischen

Medien ist, wie z. B. die Markierung von Biomolekülen. Hierzu werden Farbstoffe benötigt, die gut in wässrigen Medien löslich sind und zudem die typischen Fluoreszenz-Eigenschaften, wie z. B. hohe Fluoreszenzquantenausbeute, besitzen. Die Farbstoffe, die diesen Anforderungen genügen, sind aufgrund ihrer chemischen Struktur, in der Regel jedoch nicht oder nur unzureichend in Ölen oder Fetten löslich. Dennoch besteht in der Tribologie und Hydraulik der Bedarf an öllöslichen Fluoreszenzfarbstoffen um beispielsweise Leckagen aufzuspüren.

1.3 Fluoreszenz als Nachweismethode

Eine quantenmechanische Erklärung für das Auftreten von Fluoreszenz wurde von Kasha im Jahre 1950 gegeben [13, 14, 15]. Demnach kann ein Fluoreszenzphoton erzeugt werden, wenn ein Molekül durch einen Dipolübergang von einem angeregten Zustand in den Grundzustand überführt wird, was sich mit Hilfe des Jablonski-Diagramms veranschaulichen lässt. So wie im Jablonski-Diagramm (vgl. Abbildung 2) die Prozesse veranschaulicht und die Lage der Energieniveaus wiedergegeben werden, so ist dieses jedoch nicht dazu geeignet, Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs von einem Energieniveau in ein anderes zu liefern. Um die Übergangswahrscheinlichkeit von einem Energieniveau in ein anderes zu berechnen kann Fermi's Goldene Regel herangezogen werden [16]. Ein weiteres Modell zur Erklärung der Prozesse, die bei elektronischen Übergängen zu beachten sind, bietet das Franck-Condon-Prinzip. Dieses misst den zeitlichen Abläufen bei der Absorption und Emission eine entscheidende Rolle zu. So erfolgt die Absorption bzw. Emission eines Photons im sichtbaren bzw. UV-Bereich innerhalb eines Zeitraumes von 10^{-15} Sekunden [17]. Hingegen dauert eine molekulare Schwingung etwa 10^{-11} bis 10^{-12} Sekunden. Daraus folgt, dass sich während der Absorption bzw. der Emission die Kernkoordinaten praktisch nicht ändern [18].

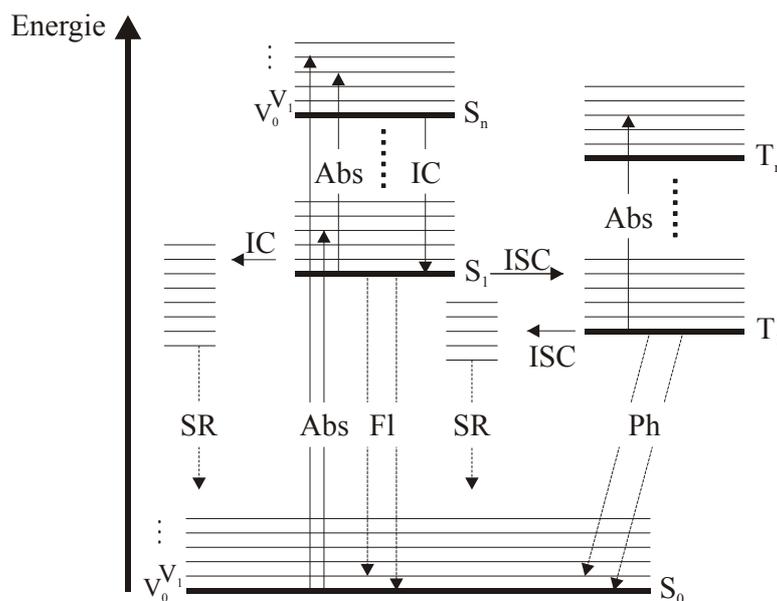


Abbildung 2: Jablonski-Diagramm

Abs: Absorption, Fl: Fluoreszenz-Übergang, IC: strahlungsloser Übergang (**I**nternal **C**onversion), ISC: Übergang vom S_1 - zum T_1 -Zustand bzw. vom T_1 - zum S_0 -Zustand (**I**nter**S**ystem **C**rossing), Ph: Phosphoreszenz-Übergang, SR: Strahlungslose Relaxation, V_x : Vibrationszustände.

Aufgrund der Boltzmannverteilung befinden sich bei Raumtemperatur fast alle Moleküle im untersten Vibrationszustand V_0 des elektronischen Grundzustandes S_0 . Aus diesem Grund findet bei der Absorption eines Photons mit geeigneter Energie ein Übergang von diesem Zustand in einen Rotations- und Vibrationszustand eines angeregten Elektronenzustandes statt. Erfolgt eine Anregung in einen höher angeregten Zustand, z. B. S_2 oder höher, so geht das Molekül typischerweise innerhalb von 10^{-12} Sekunden strahlungslos in den S_1 -Zustand über. Von hier aus kann die verbleibende Energie in unterschiedlicher Form wieder abgegeben werden. Eine Möglichkeit besteht in Form einer strahlungslosen Desaktivierung (**I**nternal **C**onversion, IC). Hierbei wird die Energie in Form von Wärme an die Umgebung übertragen, wobei das Molekül zunächst in einen hoch angeregten Schwingungszustand, den S_0 -Zustand, übergeht und von dort innerhalb weniger Pikosekunden equilibriert. Eine weitere Möglichkeit, die aufgenommene Energie wieder abzugeben, besteht in der Emission eines Photons (Fluoreszenzübergang). Hierdurch gelangt das Molekül in einen der Vibrationszustände des S_0 -Zustands, von wo es strahlungslos nach V_0 relaxiert. Die Stabilität elektronisch angeregter Moleküle im S_1 -Zustand ist zeitlich begrenzt und äußert sich durch die Fluoreszenzabklingdauer, die bei vielen Molekülen mit ausgedehntem π -Elektronensystem im Nanosekundenbereich liegt. Die Lichtemission durch Fluoreszenz ist im Allgemeinen energieärmer als die Absorption und ist aus diesem Grunde zumeist bathochrom, d. h. rot verschoben.

Ein Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Spin-Multiplizität ($S_1 \rightarrow T_1$) ist zwar nach den Auswahlregeln der Quantenmechanik verboten, aber dennoch auf Grund der Spin-Bahn-Kopplung möglich. Dieser Vorgang wird als **Intersystem Crossing (ISC)** bezeichnet und findet üblicherweise als ein Übergang vom Schwingungsgrundzustand des untersten elektronisch angeregten Singulettzustandes S_1 in ein isoenergetisches Niveau des ersten Triplettzustandes T_1 statt. Ein Übergang aus dem Triplettzustand T_1 zu den Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes S_0 verläuft teilweise durch Lichtemission. Diese Emission wird als Phosphoreszenz bezeichnet und die Abklingdauer dieses Vorgangs liegt bei vielen Systemen im Bereich von Millisekunden [19].

Am Anfang aller zuvor beschriebenen Prozesse steht die Absorption $A(\lambda)$, die durch folgende Beziehung ausgedrückt werden kann:

$$A(\lambda) = 1 - \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}. \quad (1)$$

Hierbei ist $I_0(\lambda)$ die Intensität des auf die Probe eingestrahnten Lichtstrahls und $I(\lambda)$ ist die Intensität des Lichtstrahls hinter der Probe. In diesem Zusammenhang ist für viele Zwecke die Extinktion E eine hilfreiche Größe, die sich durch das Lambert-Beer'sche Gesetz ausdrücken lässt.

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d, \quad (2)$$

hier steht c für die Konzentration der zu untersuchenden Probe, d für die Schichtdicke und mit $\varepsilon(\lambda)$ ist der molare dekadische Extinktionskoeffizient bezeichnet.

Wie zu ersehen ist, wird bei der Absorption und Extinktion die nicht absorbierte Intensität I in Beziehung zur eingestrahnten gesetzt, somit sind Bestimmungen der Absorption und Extinktion stets indirekte Nachweismethoden. Insbesondere ist zu beachten, dass für sehr kleine Absorptionen die Größen I und I_0 nahezu gleich sind. Aus diesem Grund sind Absorptionsmessungen in der Praxis um 2 bis 3 Größenordnungen weniger empfindlich als direkte Messungen, wie beispielsweise die Messung von Fluoreszenz [20].

1.3.1 Detektoren und Instrumente für den Nachweis von Fluoreszenz

Ein Detektor mit hoher spektraler Bandbreite ist das menschliche Auge. Bei ihm wird, neben der Hell-/Dunkelempfindlichkeit, die Farbempfindung durch drei Farbrezeptoren

(Rhodopsine) vermittelt. In der nachfolgenden Abbildung ist die spektrale Empfindlichkeit des Auges dargestellt.

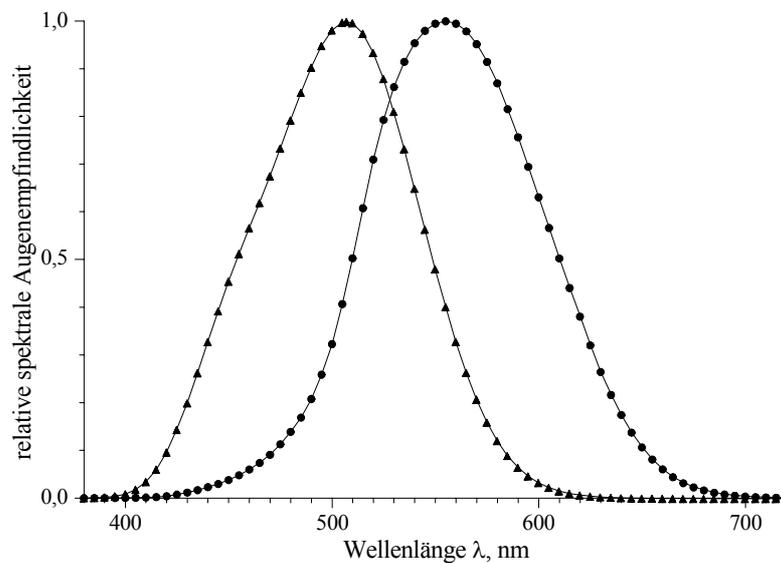


Abbildung 3: Spektrale Augenempfindlichkeit für Tag- (photopischer Bereich) und Nachtsehen (skotopischer Bereich) [21], -●-: Tagessen, -▲-: Nachtsehen.

Wie zu erkennen ist, hat das menschliche Auge seine maximale Empfindlichkeit beim so genannten Tagessen bei einer Wellenlänge von 555 nm. Für das dunkeladaptierte Auge ist die Empfindlichkeitskurve um etwa 50 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben und die maximale Empfindlichkeit liegt bei etwa 507 nm [22]. Dabei sei an dieser Stelle auf die hohe Empfindlichkeit des menschlichen Auges hingewiesen, so werden bereits 2 bis 3 Photonen als Lichterscheinung wahrgenommen [21].

Zum quantitativen Nachweis von Licht werden bevorzugt Photodioden, Photomultiplier oder pyroelektrische Detektoren eingesetzt. Bei Photodioden werden im Bereich der p/n-Übergangsschicht durch einfallende Photonen Ladungsträger getrennt, was sich außen an der Diode in Form eines elektrischen Stroms nachweisen lässt. Die spektrale Empfindlichkeit von Halbleiterdetektoren reicht vom UV- bis in den nahen IR-Bereich [23], wobei die Maximalempfindlichkeit der Detektoren meist im roten bzw. nahen IR-Bereich liegt. Eine besondere Bauart der Photodiode stellt die Avalanche Photodiode (APD) dar. Das Prinzip der APD setzt sich dabei aus den Funktionsweisen einer Z-Diode mit einem photoinduzierten Durchbruch der Sperrzone zusammen. Aufgrund des hohen elektrischen Feldes in der Sperrzone ist dieses stark genug, um ein freigesetztes Elektron auf seinem Weg zur positiv geladenen Seite des Halbleiters deutlich zu beschleunigen. Die so beschleunigten Elektronen sind in der Lage, bei Stößen mit dem Halbleitermaterial weitere Elektronen freizusetzen. Auf diese Weise lösen die aus dem Photoeffekt stammenden Elektronen bei ihrem Weg durch die Sperrzone eine exponentiell anwachsende Elektronenlawine aus. Neben einer sehr hohen

Empfindlichkeit zeichnen sich Avalanche Photodioden durch ein niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus.

Bei einem Photomultiplier werden in einer Photokathode durch einfallende Photonen Elektronen freigesetzt und, ähnlich wie bei der Avalanche Photodiode, durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Diese Elektronen treffen im Weiteren auf eine Reihe positiv geladener Elektroden (Dynoden) auf, wo sie Sekundärelektronen freisetzen, die ihrerseits beschleunigt werden und wiederum Sekundärelektronen erzeugen. Auf diese Weise kann ein einzelnes Photoelektron, je nach Photomultiplier, bis zu 10^6 Sekundärelektronen freisetzen [24]. Nachteile von Photomultipliern gegenüber Photodioden liegen zum einen in deren geringer Empfindlichkeit im roten Spektralbereich, zum anderen benötigen Photomultiplier eine Hochspannungsquelle und sind mechanisch äußerst empfindlich.

Modernere bildgebende Halbleiterdetektoren, wie z. B. CCD-Detektoren (charge-coupled device), besitzen ebenfalls eine sehr hohe Empfindlichkeit, allerdings kann mit diesen Systemen nur mit sehr hohem Aufwand eine zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung realisiert werden, was mit den zuvor beschriebenen Systemen auf einfache Weise möglich ist.

Pyroelektrische Detektoren sind thermische Empfänger, die aus ferroelektrischen Materialien, z. B. Bariumtitanoxid (BaTiO_3), bestehen. Ferroelektrische Materialien besitzen eine spontane elektrische Polarisierung, die sich mit der Temperatur ändert. Eine kurzzeitige Erwärmung, z. B. durch Licht, führt daher zu einem elektrischen Spannungsimpuls, der als Messsignal dient [25]. Ein Vorteil, den diese Systeme bieten, liegt in deren zumeist wellenlängenunabhängigen Charakteristik. Jedoch sind pyroelektrische Detektoren in der Regel nicht so empfindlich und zeigen ein langsames Ansprechverhalten.

In dieser Arbeit wurden zur Detektion von Fluoreszenz vornehmlich Avalanche Photodioden eingesetzt. Dies erfolgte unter anderem, da die zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung ein Kriterium zur Identifizierung und Unterscheidung der verwendeten Analyten war. Hierzu werden Detektoren benötigt, die eine Ansprechzeit im Bereich von Nanosekunden haben.

2 Nachweis einzelner Analytmoleküle in Lösung

2.1 Allgemeines

Bei den meisten physikalischen oder chemischen Untersuchungen werden makroskopische Systeme mit einer großen Anzahl von Teilchen betrachtet [26, 27]. Als Beispiel sei an dieser Stelle einmal Wasser als Modellsystem herangezogen. Hier besteht ein Ensemble von nur einem Liter bereits aus etwa 3×10^{25} Molekülen. Durch die Statistische Physik wird beschrieben, dass die relative Schwankung einiger Größen im Gleichgewicht, z. B. die mittlere Energie, sich reziprok zur Wurzel der Teilchenzahl verhält [28]. Aus diesem Grund zeigen diese Größen bei makroskopischen Systemen, wie dem hier betrachteten, praktisch keine messbaren Schwankungen und es sind im Wesentlichen die Gesetze der Thermodynamik zu berücksichtigen.

Um messbare Schwankungen zu beobachten, sind daher Systeme mit einer kleinen Anzahl von Molekülen zu untersuchen. Dabei muss sich das Individuum nicht zwangsläufig immer wie das Ensemble verhalten. Aus diesem Grund stellt die Detektion einzelner Moleküle eine Möglichkeit dar, die Individualität eines Moleküls zu studieren.

Typischerweise wird bei der Einzelmoleküldetektion der zeitliche Verlauf der Emission, die in einem eng begrenzten Volumen auftritt, registriert. Als elektronisches Hilfsmittel dient hierzu im einfachsten Fall ein so genannter Multichannel-Scaler (MCS) [30]. Dieser addiert alle, je Zeitintervall registrierten Signale in fortlaufende Kanäle mit fester Kanalbreite. Befindet sich im Detektionsvolumen kein fluoreszierendes Molekül, so werden nur sehr wenige Signale je Kanal registriert, im Wesentlichen das Untergrundsignal. Hingegen werden beim Durchtritt eines fluoreszierenden Moleküls durch das Detektionsvolumen viele Signale in den entsprechenden Kanälen aufaddiert und es wird ein so genannter Burst beobachtet.

2.2 Probleme bei der Detektion einzelner Moleküle

Bei Experimenten zur Detektion einzelner Moleküle sind einige Randbedingungen zu erfüllen. Um einzelne Moleküle einer bestimmten Spezies in Lösung beobachten zu können, sollte die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein solches Molekül im Detektionsvolumen befindet, möglichst kleiner als eins sein. Um dies zu erreichen, kann entweder eine Lösung mit einer geringen Konzentration dieser Moleküle verwendet oder ein kleines Beobachtungsvolumen gewählt werden. In der Praxis werden beide Bedingungen miteinander optimiert. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie sind Detektionsvolumina V_{Det} realisierbar, die im Bereich von

weniger als einem bis zu einigen Femtolitern liegen. Wird bei einem solch kleinen Volumen (z. B. 1 fL) eine Analytkonzentration c von etwa einem Nanomol pro Liter gewählt, so befindet sich im Mittel nur etwa ein Molekül im Beobachtungsvolumen. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass bei einer Analytkonzentration im Bereich von 10^{-11} bis 10^{-12} mol L⁻¹, die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül im Detektionsvolumen zu finden, deutlich kleiner als eins ist. Somit sollten sich unter Einhaltung dieser Randbedingung einzelne Moleküle studieren lassen.

Um das Ziel zu erreichen, einzelne Moleküle in Lösung beobachten zu können, ist eine Messgröße zu wählen, bei der sich das betreffende Molekül deutlich von den Lösungsmittelmolekülen unterscheidet. Hierzu kann beispielsweise die Fluoreszenz herangezogen werden. In diesem Fall ist eine Bedingung die, dass die Fluoreszenz eines Analytmoleküls sich deutlich von der Emission des Lösungsmittels abhebt, dabei tritt dann der Beitrag des Lösungsmittels als Untergrundsignal auf. Grundsätzlich kann das bei der Einzelmoleküldetektion auftretende Untergrundsignal unterschiedliche Ursprünge haben. Einen erheblichen Anteil trägt gestreutes Anregungslicht zum Signaluntergrund bei, das proportional zur ins Detektionsvolumen eingestrahlten Lichtleistung ist und sich aus elastisch (Reflexion und Rayleigh-Streuung) und inelastisch (Raman-Streuung) gestreutem Licht zusammensetzt. Das elastisch gestreute Licht hat dieselbe Wellenlänge wie das eingestrahlte Anregungslicht und kann daher effektiv, mittels optischer Filter unterdrückt werden. Hingegen ist das inelastisch gestreute Anregungslicht im Wesentlichen langwellig verschoben und kann daher im Bereich der Fluoreszenz auftreten.

Neben gestreutem Anregungslicht können ebenfalls fluoreszierende Verunreinigungen Einfluss auf den Signaluntergrund nehmen. Diese führen zu unerwünschten Signalen und erschweren auf diese Weise die Detektion der eigentlichen Analytmoleküle. In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass die Verwendung destillierter Lösungsmittel einen positiven Einfluss auf den Signaluntergrund hat.

2.3 Komponenten zum experimentellen Nachweis einzelner Moleküle

2.3.1 Lichtquellen für eine konfokale Anregung

Aufgrund der hohen zeitlichen und räumlichen Kohärenz von Laserlicht eignen sich besonders Laser zur konfokalen Anregung. So kann ein Laserstrahl beugungsbegrenzt bis in den Submikrometer-Bereich fokussiert werden [31]. Ferner ist die spektrale Breite der

Laseremission sehr gering und bei vielen Lasern ist die Emissionswellenlänge fix. Beide Eigenschaften sind dazu geeignet, die experimentellen Rahmenbedingungen auf einfache Weise an die Laserstrahlung anzupassen.

2.3.2 Emissionswellenlänge des Diodenlasers

Bei Gaslasern ist die Emissionswellenlänge durch die atomaren Übergänge bedingt fest. Hingegen hängt die Emissionswellenlänge bei Halbleiterlasern von mehreren Parametern ab. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass beispielsweise der Dotierungsgrad einen Einfluss auf die Emission hat, was dazu führt, dass nicht jede Laserdiode eines Typs bei exakt der gleichen Wellenlänge emittiert. In gleicher Weise nimmt die Temperatur Einfluss auf die Emissionswellenlänge und Emissionsbreite. Auch wenn die spektrale Verschiebung in der Regel nur wenige Nanometer beträgt, kann dies doch eine Rolle spielen, da das eingesetzte Filtersystem, bestehend aus Anregungs- und Detektionsfilter sowie dem dichroitischen Strahlteiler, auf die Emissionswellenlänge des Lasers abgestimmt sind. So liegt bei dem verwendeten schmalbandigen Anregungsfilter das Maximum der Transmission bei 633 nm mit einer Transmission von 46,5 %. Die Halbwertsbreite des Filters beträgt aber nur 1,05 nm, siehe Anhang 7.1, Abbildung 42. Bei einer spektralen Verschiebung der Laseremission von beispielsweise nur einem Nanometer liegt der Transmissionsgrad des Anregungsfilters bei nur noch 6 %, so dass die verbleibende Anregungsleistung für Einzelmolekül-Experimente nicht mehr ausreichend wäre. Zur Ermittlung der Emissionswellenlänge des verwendeten Lasers wurde ein kommerzielles Fluoreszenzspektralphotometer (Modell Fluorolog 2, Firma Spex) eingesetzt. In der nachfolgenden Abbildung ist der Probenraum des Spektrometers schematisch dargestellt.

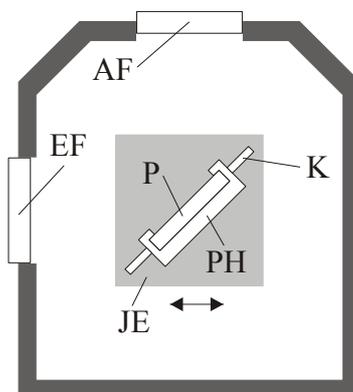


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Probenraums im Fluorolog; AF: Austrittsfenster, EF: Eintrittsfenster, JE: Justage-Einheit, K: Kühlung; P: Probe; PH: Probenhalterung.

Um die Emissionswellenlänge des Diodenlasers bestimmen zu können, musste der Probenraum des Spektrometers so verändert werden, dass der Strahl des Diodenlasers in die

Detektionseinheit eingekoppelt werden konnte. Hierzu wurde der Diodenlaser so positioniert, dass dessen Strahl auf eine mit Streukörper gefüllte Küvette fiel und die gestreute Laserstrahlung durch das Austrittsfenster in den Monochromator eintreten konnte. Um den Photomultiplier nicht zu beschädigen, wurde die Intensität des Laserstrahls durch einen geeigneten Graufilter abgeschwächt.

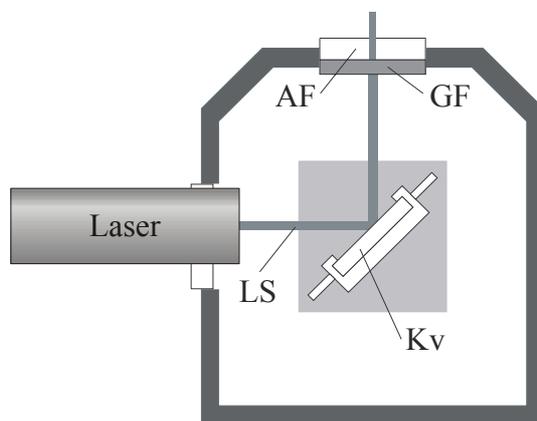


Abbildung 5: Experimenteller Aufbau zur Wellenlängenbestimmung des Diodenlasers; AF: Austrittsfenster, GF: Graufilter, 3 mm; Kv: mit Streukörper gefüllte Küvette, LS: Laserstrahl; Laser: Diodenlaser

Mit dem beschriebenen Aufbau konnte die Emissionswellenlänge des Lasers bestimmt werden. In Abbildung 6 ist ein Spektrum der Emission des Diodenlasers im Wellenlängenbereich von 625 bis 640 nm dargestellt. Wie zu erkennen ist, liegt das Emissionsmaximum des Lasers bei $\lambda = 632,4$ nm, mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von 3,1 nm.

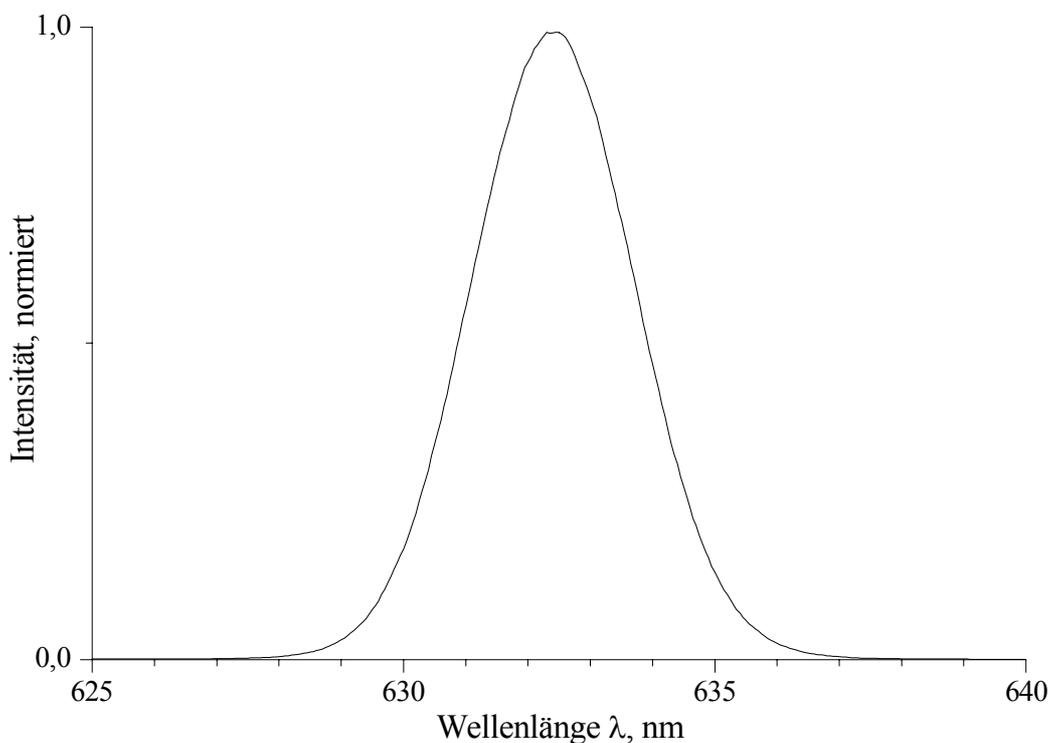


Abbildung 6: Spektrum des Diodenlasers im Bereich von 625 bis 640 nm, bei einer Laserleistung von 50 μ W.

Bedingt durch die Temperaturabhängigkeit von Diodenlasern ergibt sich ebenso eine Verschiebung der Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der emittierten Leistung [29]. Dieses Phänomen wird durch die folgende Messreihe aufgezeigt, bei der das Emissionsmaximum als Funktion von der Laserleistung ermittelt wurde. Zu diesem Zweck wurde zu jeder eingestellten Leistung ein Spektrum aufgenommen und das Maximum der Emission sowie die Halbwertsbreite ermittelt. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, verschiebt sich das Maximum der Emission nahezu linear bathochrom mit der Laserleistung.

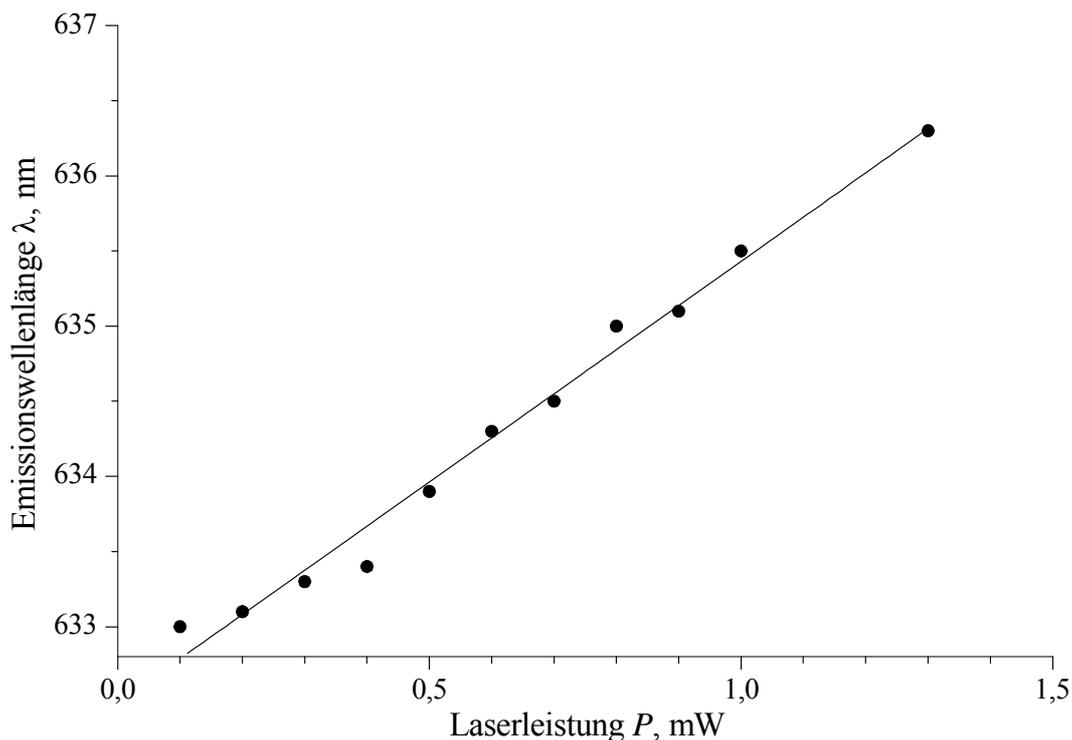


Abbildung 7: Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der Laserleistung, — lineare Regression.

Bei den oben beschriebenen Experimenten zur Bestimmung der Emissionswellenlänge ergab sich, dass die spektrale Breite der Emission oberhalb Laserleistungen von 0,6 mW deutlich zunimmt. Auch dieses Verhalten kann auf die im Laser entstehende Wärme zurückgeführt werden. In Abbildung 8 ist Halbwertsbreite der Emission in Abhängigkeit von der Laserleistung wiedergegeben.

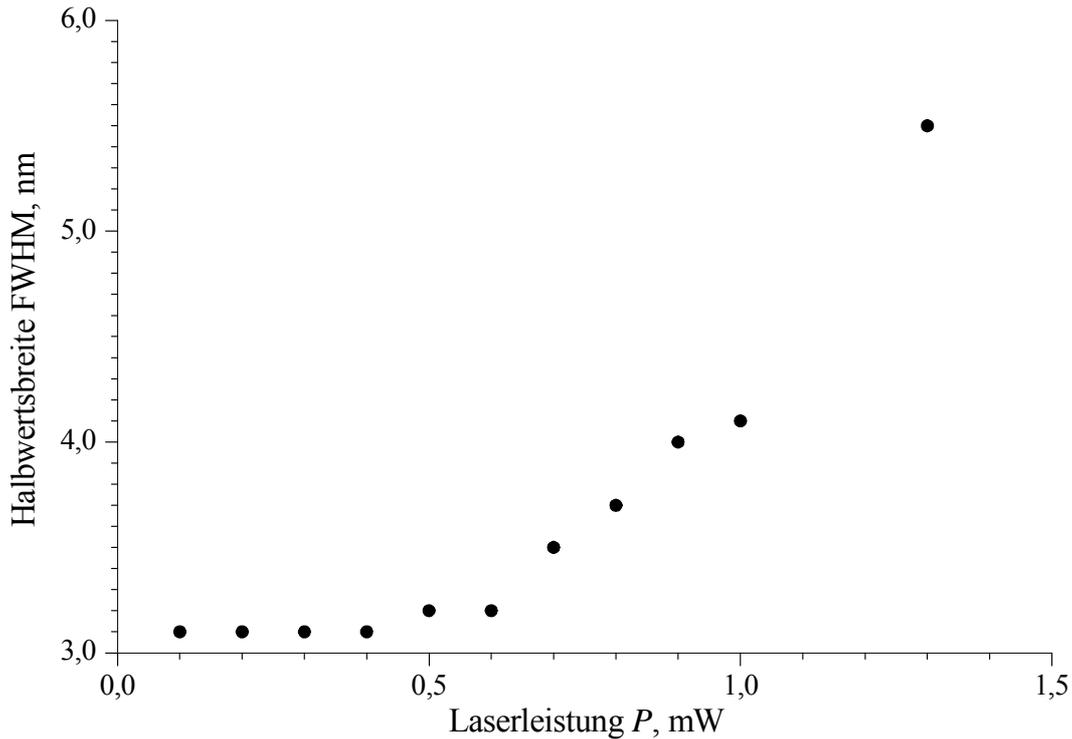


Abbildung 8: Halbwertsbreite in Abhängigkeit von der Laserleistung

Um sicherzustellen, dass die Wellenlängenverschiebung und die Verbreiterung der Emission keinen Einfluss auf die Untersuchungen in dieser Arbeit haben, wurde die Laserleistung bei den Experimenten stets unter 0,6 mW gehalten.

2.3.3 Ermittlung der Fokus-Dimensionen des experimentellen Aufbaus

Neben der Kenntnis der Emissionswellenlänge eines Lasersystems ist ebenfalls die Geometrie des Laserfokus in der Probe eine wichtige Größe. Dies gilt insbesondere, da durch die Fokussierung des Laserstrahls mittels des Mikroskop-Objektivs bei den experimentellen Aufbauten in dieser Arbeit das Detektionsvolumen definiert wird. Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben ist, hat die Ausdehnung des Laserfokus zudem eine direkte Auswirkung auf die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS).

Um die Intensitätsverteilung der Anregung in der Fokalebene zu bestimmen, wurde der in Abbildung 9 dargestellte Aufbau verwendet. Bei diesem Aufbau wurde der Fokus durch ein zweites Objektiv vergrößert abgebildet. Dies war notwendig, da die Abmessungen des Fokus selbst im Mikrometer-Bereich liegen und somit eine direkte Bestimmung dessen Dimensionen nur mit hohem Aufwand möglich ist. Entsprechend dem experimentellen Aufbau konnte die Intensitätsverteilung im Fokus auf eine Bestimmung der Intensitätsverhältnisse in der Bildebene des zweiten Objektivs zurückgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde eine, auf einen xy-Linearverstärker montierte Photodiode verwendet, vor der sich eine Lochblende

(Durchmesser $10\ \mu\text{m}$) befand. Um Störlicht möglichst zu unterdrücken, wurde eine phasenkorrelierte Messung (Lock-In-Technik) durchgeführt. Zur Realisierung der notwendigen Modulation wurde ein Chopper (Ch) mit definierter Frequenz in den Strahlengang gebracht. Das auf diese Weise ermittelte Intensitätsprofil ist in Abbildung 10 wiedergegeben.

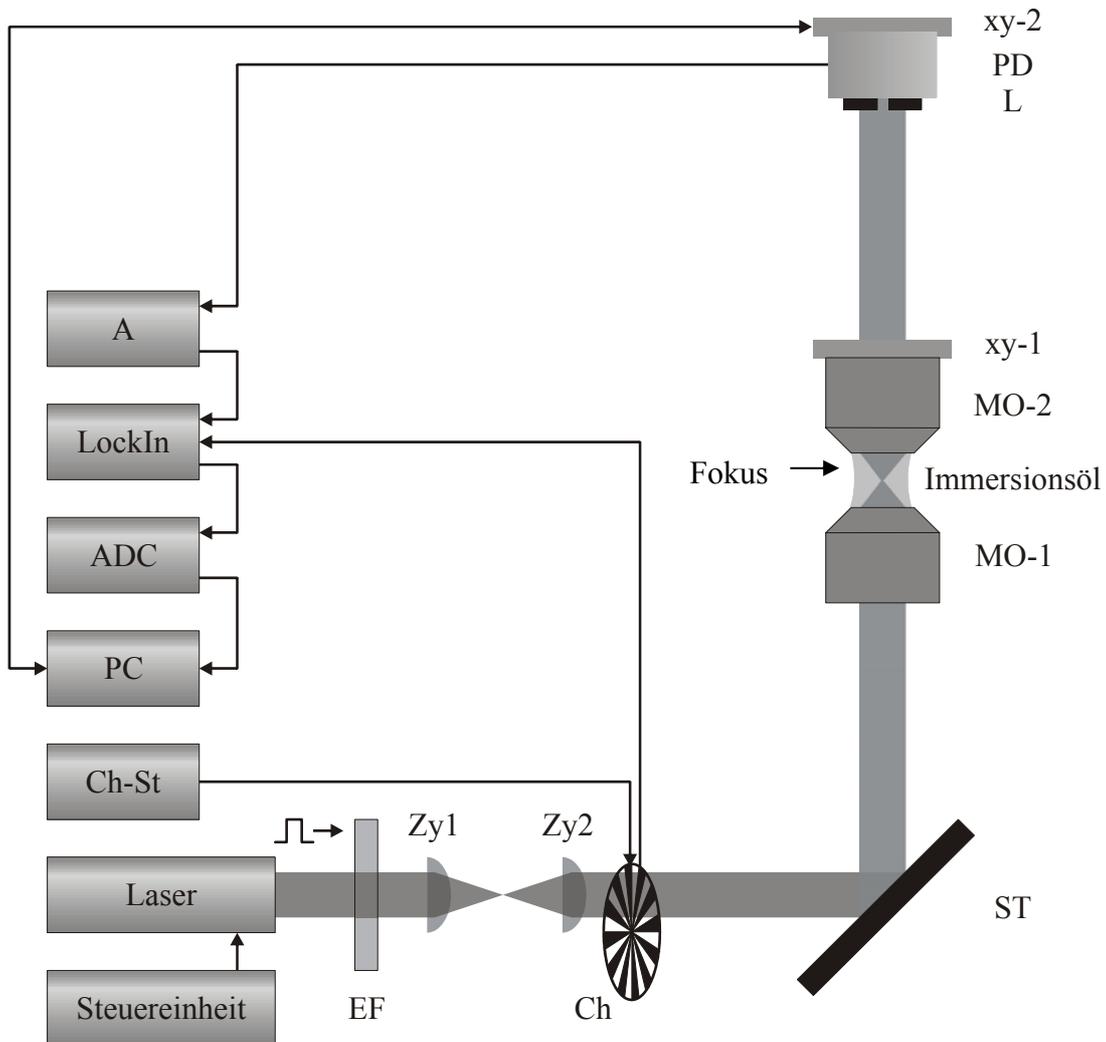


Abbildung 9: Schematischer Aufbau zur Bestimmung der Fokus-Dimensionen

A: Stromverstärker, ADC: Analog-Digital-Converter, Ch: Chopper, Ch-St: Chopper-Steuerung, EF: Emissionsfilter, L-2: Lochblende ($10\ \mu\text{m}$), Laser: gepulster Laserdiode mit Steuereinheit, LockIn: Lock-In-Verstärker, MO-1, MO-2: Mikroskop-Objektive, PC: Computer, PD: Photodiode, ST: Strahlteiler, xy-1, xy-2: Verschiebeeinheiten, Zy1, Zy2: Zylinderlinsen

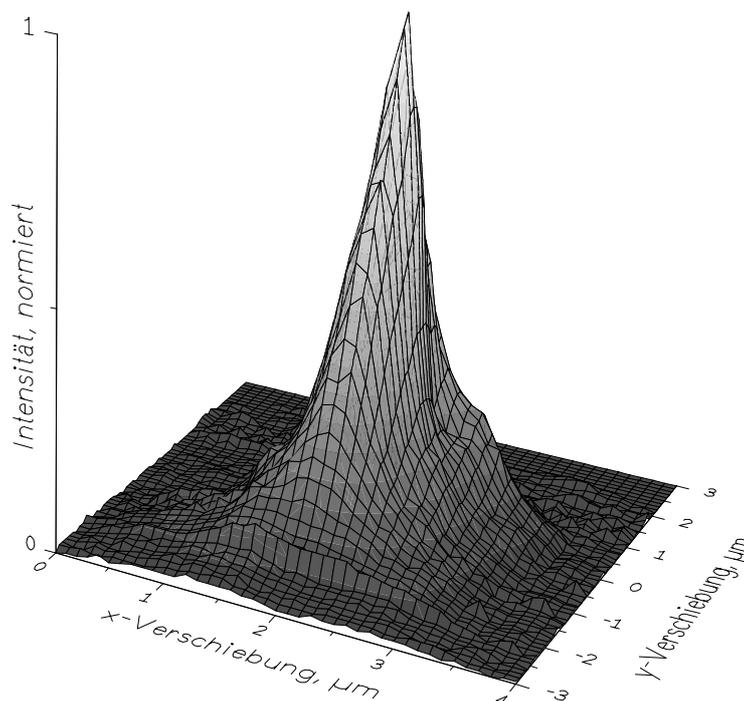


Abbildung 10: Dreidimensionale Darstellung des Laserfokus

Aus der Messung ergab sich ein in x- und y-Richtung symmetrisches gaußförmiges Intensitätsprofil mit einer Halbwertsbreite (**F**ull **W**idth **H**alf **M**aximum) in x-Richtung von $0,61 \mu\text{m}$ und in y-Richtung von $0,60 \mu\text{m}$. In der nachfolgenden Tabelle sind weitere Angaben zur Fokus-Dimension angegeben. Ausgehend von diesem Ergebnis wurden diese Werte für die Geometrie bei den FCS-Messungen, zur Bestimmung des Detektionsvolumens, eingesetzt.

Tabelle 1: Fokus-Dimensionen

| | FWHM, μm | $1/e$, μm | $1/e^2$, μm |
|------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|
| x-Richtung | 0,61 | 0,37 | 0,52 |
| y-Richtung | 0,60 | 0,36 | 0,51 |

2.3.4 Optische Filtersysteme zur Unterdrückung von Fremdlicht

In der Spektroskopie ist es oft von Vorteil, Strahlung mit geringer spektraler Bandbreite und hoher Intensität zu verwenden. In der Regel werden aus diesem Grund Laser eingesetzt. Laser emittieren monochromatisches Licht, d. h. Licht einer Wellenlänge. Dennoch ist es möglich, dass ein Laser ebenso eine Emission bei höheren Wellenlängen zeigt. Bedingt durch den optischen Aufbau und Umgebungseinflüssen, wie z. B. dem Lösungsmittel, kommt es auch zu Rayleigh- und Raman-Streuung, die ebenso eine Detektion erschweren. Aus diesen Gründen werden optische Filter eingesetzt, um bestimmte Wellenlängenbereiche zu diskriminieren.

Optische Filter lassen sich in Absorptions- und Interferenzfilter einteilen. Im Bereich der Absorptionsfilter finden häufig Feststoff-Filter Einsatz, die in der Regel als Kantenfilter (Cut-Off-Filter) dienen. Diese Filter absorbieren kurzwelliges Licht und sind für langwelliges Licht transparent [32]. Soll hingegen ein schmaler Wellenlängenbereich diskriminiert werden, so bieten sich besonders Interferenzfilter an. Darüber hinaus lassen sich mit Interferenzfilter sehr hohe optische Dichten erzielen, so dass die Blockung von unerwünschten spektralen Anteilen besonders hoch ist. Ein Nachteil von Kantenfiltern ist überdies, dass diese bei hohen Intensitäten selbst zur Fluoreszenz neigen. Um eine optimale Blockung von Anregungs- und Streulicht zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit vorwiegend Interferenzfilter eingesetzt, deren Charakteristika im Anhang wiedergegeben sind.

2.3.5 Anordnung des Probevolumens

Für die Probenanordnung haben sich zwei mögliche Anordnungen als besonders geeignet herausgestellt. Zum einen kann die Probelösung direkt auf ein Mikroskop-Objektiv aufgetragen werden, zum anderen besteht die Möglichkeit sie, wie in der Mikroskopie oft üblich, in einen Objektträger mit Vertiefung zu geben und mit einem Deckglas zu versiegeln (siehe Abbildung 11).

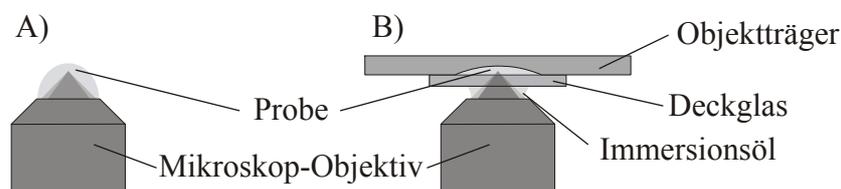


Abbildung 11: Anordnungen des Probevolumens

Bei der Anordnung wie unter A) gezeigt, befindet sich die Probe offen auf dem Mikroskop-Objektiv. Ein Nachteil hierbei ist, dass Verunreinigungen aus der Umgebung relativ leicht in die Probe eingetragen und die Messungen hierdurch beeinflusst werden. Ferner hat sich gezeigt, dass eine direkte Auftragung der Probe auf das Objektiv zu einer Kontamination der Optik führt. Daneben kann es aufgrund des Lösungsmitteldampfdruckes dazu kommen, dass die Probe austrocknet. Reproduzierbare Ergebnisse sind daher mit dieser Methode nur schwer zu erzielen. Bei einer Anordnung wie unter B) dargestellt, ist die Probe hingegen abgeschlossen, so dass kaum Verunreinigungen eingetragen werden, des weiteren wird das Eintrocknen der Probe verhindert. In der Praxis besteht ein Weiterer Vorteil dieser Anordnung, dass sich Proben schnell und unkompliziert austauschen lassen. Aufgrund der genannten Vorteile wurde bei den in dieser Arbeit beschriebenen Messungen auf Einzelmolekül-Ebene die Anordnung wie unter B) gezeigt verwendet, sofern sie nicht in Kapillaren durchgeführt wurden.

2.3.6 Anforderungen an die Analytmoleküle

Bei der Auswahl der Analytmoleküle sind unterschiedliche Kriterien heranzuziehen. So sollten die Moleküle eine möglichst hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzen und zur optimalen Anregung ist darauf zu achten, dass das Maximum der Farbstoffabsorption im Bereich der Emissionswellenlänge des verwendeten Lasersystems liegt. Um eine möglichst hohe Anzahl von Absorptions- und Emissionszyklen zu erreichen, ist es von Vorteil, wenn die verwendeten Farbstoffe eine hohe Photostabilität besitzen. Ist zudem beabsichtigt, unterschiedliche Spezies von Fluoreszenzfarbstoffen in einem Experiment zu beobachten, so ist es sinnvoll, Moleküle mit unterschiedlicher Fluoreszenzabklingdauer einzusetzen.

Im Hinblick auf die in Kapitel 3 beschriebene Kapillarelektrophorese ist es außerdem von grundlegender Bedeutung, Farbstoffe mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität zu wählen. In Vorversuchen erwiesen sich in diesem Zusammenhang die Fluoreszenzfarbstoffe HIDCI, JA22E, JA33 und JA34 als gut geeignet. Die Strukturen sowie die spektralen Daten der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind dem Anhang zu entnehmen.

2.4 Methodik zur Identifizierung einzelner Moleküle

2.4.1 Das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen

Zur Identifikation eines fluoreszierenden Moleküls können unterschiedliche Eigenschaften herangezogen werden, wie beispielsweise das Absorptions- oder Emissionsspektrum. Eine weitere Möglichkeit verschiedene Farbstoffspezies zu unterscheiden, besteht darin, diese anhand ihrer Fluoreszenzabklingdauer zu unterscheiden.

Dabei lässt sich die natürliche Fluoreszenzabklingdauer τ eines Farbstoffs nach der folgenden Beziehung aus den Absorptions- und Emissionsspektren abschätzen [33]:

$$\tau = \frac{3,5 \cdot 10^8 \cdot w}{\tilde{\nu}_m^2 \cdot \int \varepsilon d\tilde{\nu}} \quad (3)$$

Hier stellt w den Entartungsgrad (Multiplizität), $\tilde{\nu}_m$ die mittlere Wellenzahl der Absorptionsbande und $\int \varepsilon d\tilde{\nu}$ den integralen Extinktionskoeffizienten der Absorptionsbande dar. Soll für ein Farbstoffmolekül die Fluoreszenzabklingdauer nur grob abgeschätzt werden, so kann in erster Näherung folgender Zusammenhang benutzt werden:

$$\tau = \frac{10^{-4}}{\varepsilon_{\max}} \quad (4)$$

wobei ε_{\max} für den Maximalwert des dekadischen Extinktionskoeffizienten steht.

Experimentell wird normalerweise jedoch nicht die natürliche Abklingdauer eines Farbstoffmoleküls beobachtet. Dies liegt daran, dass desaktivierende Mechanismen, wie das Intersystem Crossing (ISC), und die interne Konversion (IC) mit der Fluoreszenz konkurrieren. Auf diese Weise ist die beobachtete Fluoreszenzabklingdauer τ_{exp} stets kürzer als die natürliche Abklingdauer:

$$\tau_{\text{exp}} = \frac{1}{k_F + \sum_i k_i} \quad (5)$$

Hier steht k_F für die Geschwindigkeitsrate der Fluoreszenz und k_i für die Geschwindigkeitsraten aller anderen desaktivierenden Prozesse.

Stammt die Fluoreszenz von einem einzelnen angeregten Zustand, z. B. aus dem vibronischen Grundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands, so ergibt sich ein monoexponentielles Abklingverhalten.

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (6)$$

dabei ist die Abklingdauer τ als die Zeit definiert, nach der die Fluoreszenzintensität auf 1/e des Anfangswertes abgeklungen ist.

Um die Fluoreszenzabklingdauer zu bestimmen, kann die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung verwendet werden, auch bezeichnet als: time-correlated single-photon counting (TCSPC) [34], oder seit neuestem ‚single-photon timing‘. Bei dieser Methode wird die Probe mit einem kurzen Lichtpuls angeregt und gleichzeitig eine „Uhr“ gestartet. Diese Uhr wird mit der Detektion des ersten registrierten Fluoreszenzphotons gestoppt. Durch wiederholte Durchführung dieser Messung und dem Eintragen der gemessenen Emissionszeiten in ein Histogramm ergibt sich die Fluoreszenzabklingkurve des betreffenden Farbstoffs. In der Praxis kann eine derartige Messung mit Hilfe einer speziellen PC-Einsteckkarte erfolgen, die z. B. alle 10 ms eine Fluoreszenzabklingkurve aus den eintreffenden Signalen bildet. Die Fluoreszenzabklingkurve einer solchen Karte setzt sich beispielsweise aus k Zeitkanälen zusammen. Hierdurch ergibt sich eine „Kurve“ n_i , wobei n_i die Zahl der registrierten Ereignisse n im Zeitkanal i angibt. Die Bestimmung der

Fluoreszenzabklingdauer kann dann, z. B. mit Hilfe der Methode des Maximum Likelihood Estimators (MLE) [35] erfolgen, dabei ist der MLE durch

$$1 + \left(e^{T/\tau} - 1 \right)^{-1} - m \left(e^{mT/\tau} - 1 \right)^{-1} = N^{-1} \sum i \cdot N_i \quad (7)$$

gegeben. Hier stellen T die Beobachtungszeit, τ die Fluoreszenzabklingdauer, m die Anzahl der Kanäle und N die Summe der Ereignisse dar. N_i gibt die Anzahl der Ereignisse im Zeitkanal i wieder.

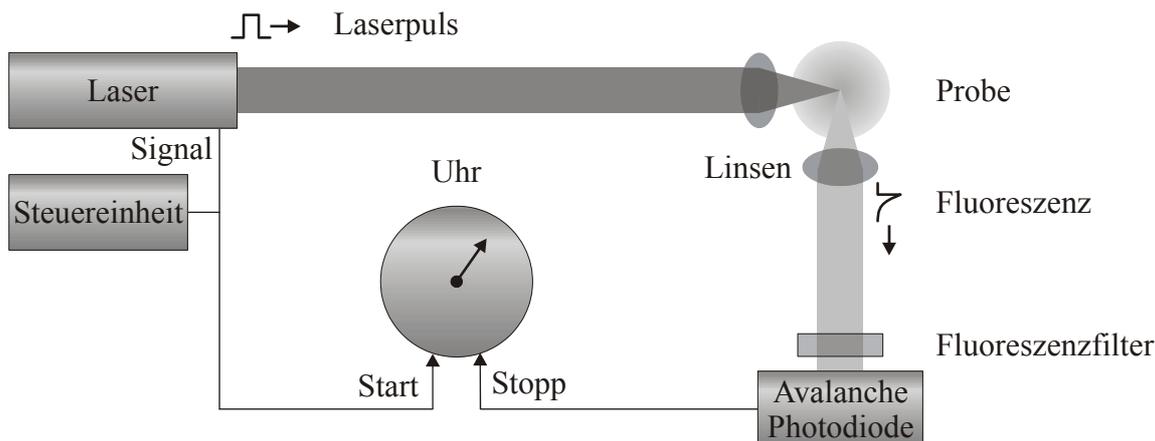


Abbildung 12: Schematischer Aufbau für die zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung

Die Zeitnahme des TCSPC-Moduls erfolgt zwischen dem Laser (Startsignal) und der Diode (Stoppsignal).

Da der in Gleichung (7) beschriebenen MLE von einem monoexponentiellen Zerfall ausgeht, wird das so erhaltene Ergebnis typischerweise durch die dem Fluoreszenzsignal überlagerte Gerätefunktion (IRF; Instrumental Response Function) verfälscht. Deren Einfluss lässt sich aber unter Zuhilfenahme einer Streuprobe (Scatter) ermitteln und eliminieren. Zu diesem Zweck wird die IRF bestimmt und durch eine Entfaltung kann die „wahre“ Fluoreszenzabklingkurve berechnet werden.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit waren zwei Randbedingungen ausschlaggebend, dass eine Entfaltung nicht durchgeführt wurde. So war es einerseits nicht Ziel dieser Experimente, die Abklingdauer eines Farbstoffs möglichst exakt zu bestimmen, sondern es sollten die unterschiedlichen Spezies nur eindeutig unterschieden werden. Ferner werden bei Einzelmolekül-Messungen nur wenige Signale, in besten Fällen einige hundert Signale, je Molekül registriert. Hier hat sich gezeigt, dass eine Entfaltung, aufgrund der geringen Statistik, nicht zu einer gesteigerten Sicherheit bei der Identifikation führt [36].

2.4.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Eine zur Untersuchung dynamischer Prozesse geeignete Methode ist die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS). Die FCS basiert auf der Analyse von Schwankungen der Fluoreszenzintensität. Hier repräsentiert die Autokorrelation $A(\tau)$ die einfachste Form der Korrelation und ist durch folgenden Zusammenhang gegeben:

$$A(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t) \times I(t + \tau) d\tau. \quad (8)$$

Anschaulich gibt somit die Autokorrelation der Fluoreszenzintensität Auskunft darüber, inwieweit die Signalintensität zum Zeitpunkt t mit der Signalintensität zum Zeitpunkt $t + \tau$ korreliert. In der Theorie sollte sich das betrachtete Zeitintervall idealer Weise über einen unendlich langen Zeitraum erstrecken. Aus nahe liegendem Grund wird aber in der Praxis nur ein endliches Zeitintervall von $2T$ betrachtet.

Unter Vernachlässigung von Effekten, die durch den Triplettzustand hervorgerufen werden, und unter der Annahme, dass die betreffenden Moleküle gemäß dem Fick'schen Gesetz frei und interaktionslos diffundieren, ergibt sich für die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ aus den Fluoreszenzintensitätsschwankungen eines Teilchens der folgende Zusammenhang [36]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2}. \quad (9)$$

Dabei steht N für die mittlere Zahl der Teilchen im Detektionsvolumen, τ_D für die Diffusionszeit, τ für die Korrelationszeit und w_0 gibt in der Fokalebene den Abstand von der optischen Achse an, bei dem die Anregungsintensität auf e^{-2} des Maximalwertes gesunken ist. Analog steht z_0 für den axialen Abstand von der Fokalebene, bei dem die Anregungsintensität auf e^{-2} des Maximalwertes im Fokus gesunken ist. Aus den Messungen in Kapitel 2.3.3 ist w_0 bei den in dieser Arbeit verwendeten Aufbauten mit etwa $0,51 \mu\text{m}$ gegeben.

Besonders interessant ist bei der FCS, dass mit ihr der Diffusionskoeffizient D ermittelt werden kann. So hängt der Diffusionskoeffizient mit der charakteristischen Zeit der Diffusion τ_D in folgender Weise zusammen:

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4 \cdot D}. \quad (10)$$

Andererseits ist der Diffusionskoeffizient klassisch durch die Stokes-Einstein-Beziehung gegeben:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}, \quad (11)$$

hierbei stellen k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η die Viskosität des umgebenden Mediums (Lösungsmittel) und r den Molekülradius dar. Durch diese Zusammenhänge lassen sich z. B. Bedingungen, bei denen sich der Diffusionskoeffizient der fluoreszierenden Komponente ändert, studieren.

In der Absicht das Diffusionsverhalten einiger in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffe zu untersuchen, wurde der in Abbildung 13 dargestellte Versuchsaufbau verwendet. Bei diesem Aufbau erfolgte die Anregung der Probe mit einem Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 633 nm. Um langwellige Emissionen des Lasers zu unterdrücken, passierte der Strahl einen schmalbandigen Emissionsfilter. Zur Einkopplung des Anregungsstrahls in den Strahlengang eines inversen Mikroskops wurde ein Strahlteiler zu Hilfe genommen. Die Fokussierung des Anregungslichts in die Probe erfolgte durch ein Mikroskop-Objektiv mit großer Apertur (SPlanAPO 100×, NA = 1,4 Öl; Olympus, Japan). Die in der Probe auftretende Fluoreszenz wurde mit demselben Objektiv gesammelt und passierte den Strahlteiler und einen Fluoreszenzfilter. Dieser Filter hatte zur Aufgabe, gestreutes Anregungslicht zu diskriminieren. Hinter dem Fluoreszenzfilter wurde der Strahl durch eine Sammellinse auf eine Lochblende mit einer dahinter befindlichen Avalanche Photodiode fokussiert. Die Signale der Avalanche Photodiode wurden mit einem Hardware-Korrelator, bzw. parallel dazu im Multichannel-Scaler (MCS), elektronisch verarbeitet.

In der Abbildung 14 sind die Fluoreszenzkorrelationskurven der verwendeten Farbstoffe abgebildet. Hierzu wurde die in Abbildung 11 mit B) bezeichnete Probenanordnung benutzt. Die einzelnen Farbstoffe wurden für die Experimente in Ethylenglykol gelöst.

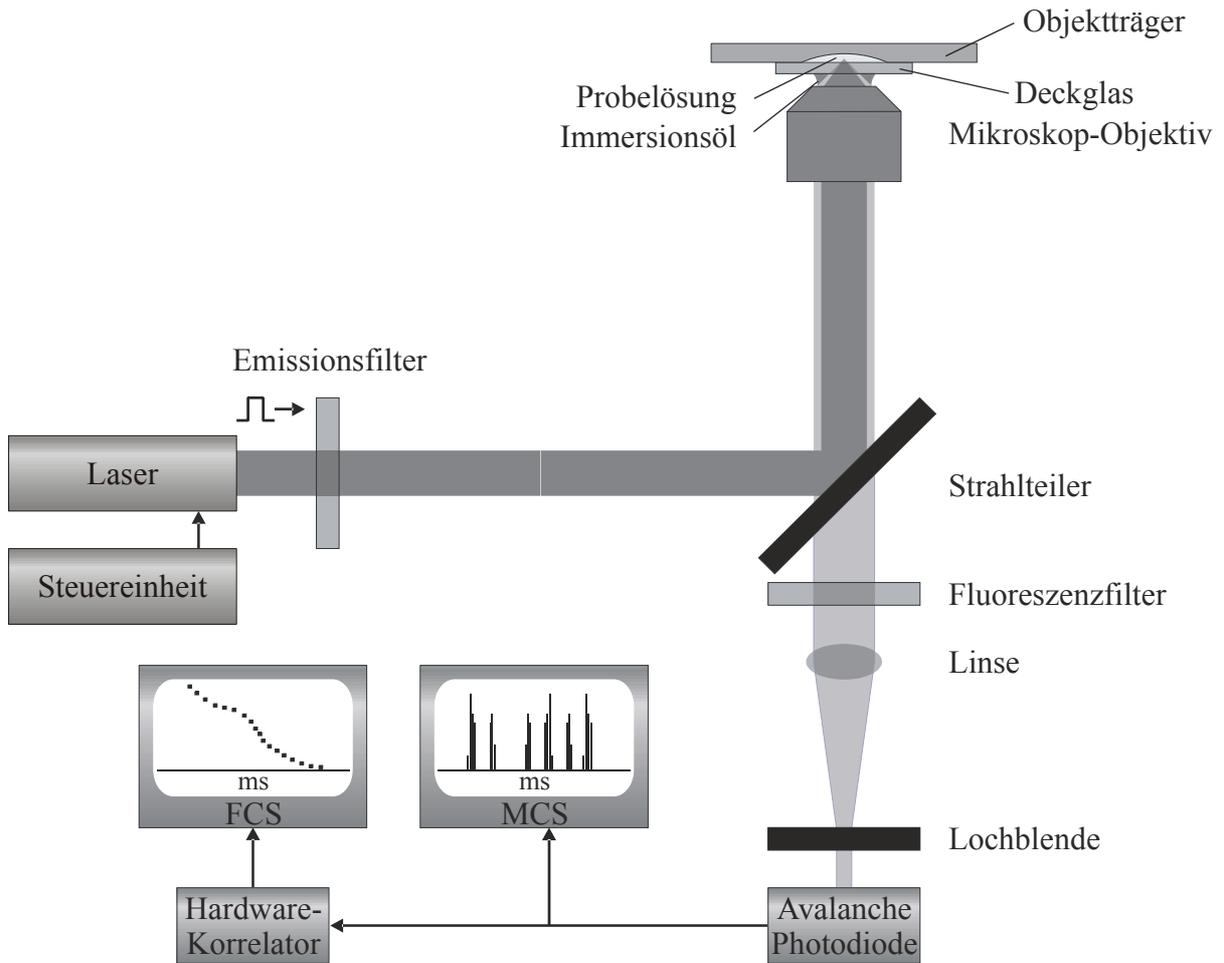


Abbildung 13: Experimenteller Aufbau für die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

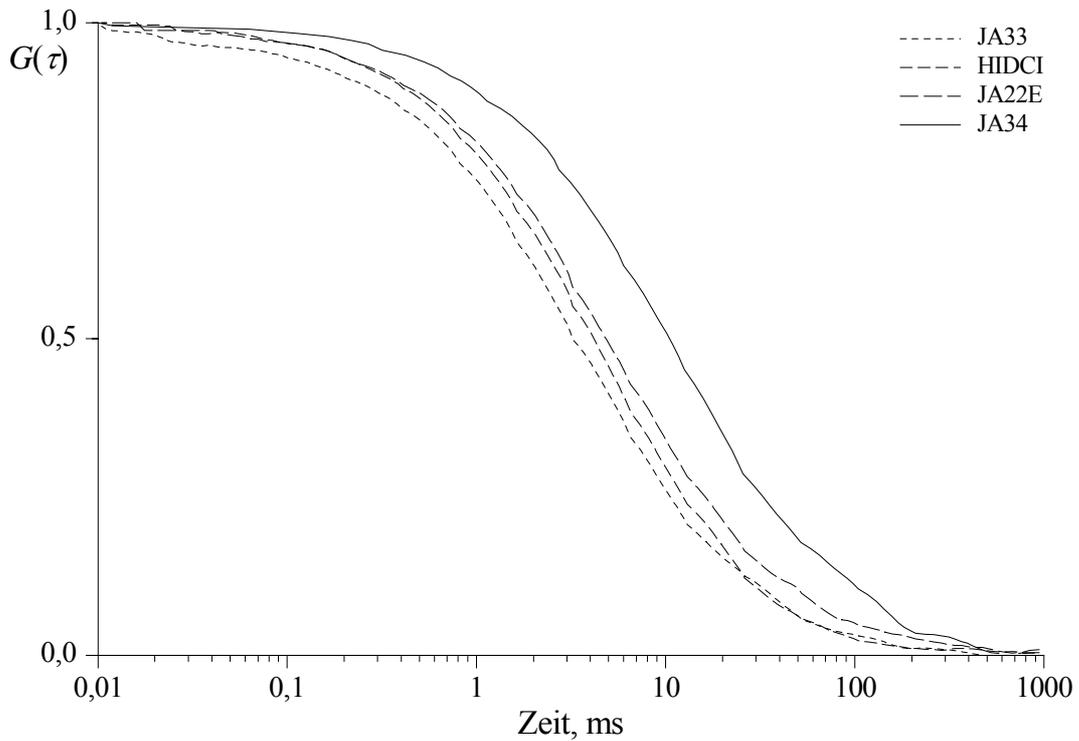


Abbildung 14: Fluoreszenzkorrelationskurven von HIDCI, JA22E, JA33, JA34 in Ethylenglykol.

Aus den Korrelationskurven in Abbildung 14 ergeben sich die in Tabelle 2 angegebenen Diffusionszeiten τ_D . Bei einem Radius des Detektionsvolumens $w_0 = 0,51 \mu\text{m}$, vgl. Tabelle 1, und unter Berücksichtigung von Gleichung (10) ergeben sich die ebenfalls in Tabelle 2 angegebenen Diffusionskoeffizienten D .

Tabelle 2: Diffusionszeiten und -koeffizienten der Farbstoffe HIDCI, JA22E, JA33, JA34 in Ethylenglykol

| Farbstoff | τ_D , ms | D , $\mu\text{m}^2 \text{ms}^{-1}$ |
|-----------|---------------|--------------------------------------|
| JA33 | 3,10 | $2,09 \times 10^{-2}$ |
| HIDCI | 4,05 | $1,61 \times 10^{-2}$ |
| JA22E | 4,95 | $1,31 \times 10^{-2}$ |
| JA34 | 10,05 | $0,65 \times 10^{-2}$ |

2.5 Detektion individueller Analytmoleküle in Lösung

2.5.1 Konzentration der Analytmoleküle

Im vorangegangenen Text wurde erwähnt, dass die Konzentration der Analytmoleküle bei einem Detektionsvolumen im Femtoliterbereich bei 10^{-10} und $10^{-12} \text{mol L}^{-1}$ liegen sollte. Um diese Aussage zu verdeutlichen, wurden die nachfolgenden Messungen durchgeführt. Für diese Versuchsreihe wurde der Farbstoff JA22 unter Zusatz von Triethylamin in einer Konzentration von $10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ in Ethylenglykol gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Lösungen mit Farbstoffkonzentrationen von 10^{-8} (Abbildung 15), 10^{-10} (Abbildung 16) und $10^{-12} \text{mol L}^{-1}$ (Abbildung 17) durch Verdünnung mit Ethylenglykol hergestellt.

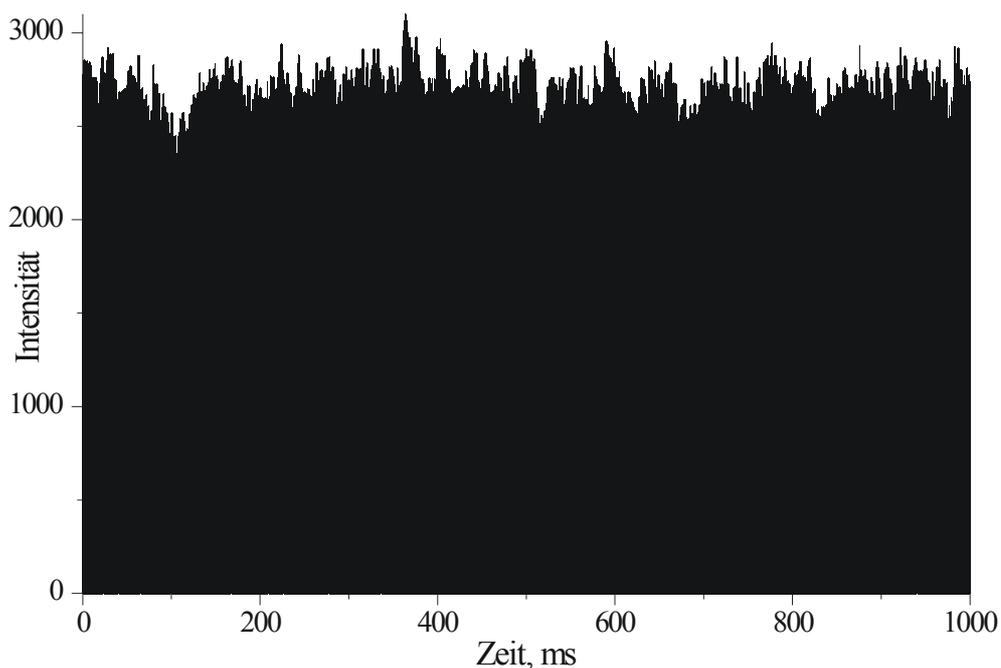


Abbildung 15: MCS-Spur von JA22 in Ethylenglykol, $c(\text{JA22}) = 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$

Wie der Abbildung 15 zu entnehmen ist, ist die Konzentration einer 10^{-8} molaren Farbstofflösung so hoch, dass in der MCS-Spur lediglich eine starke Fluoreszenz detektiert wird. Und es treten keine Ereignisse von individuellen Molekülen hervor.

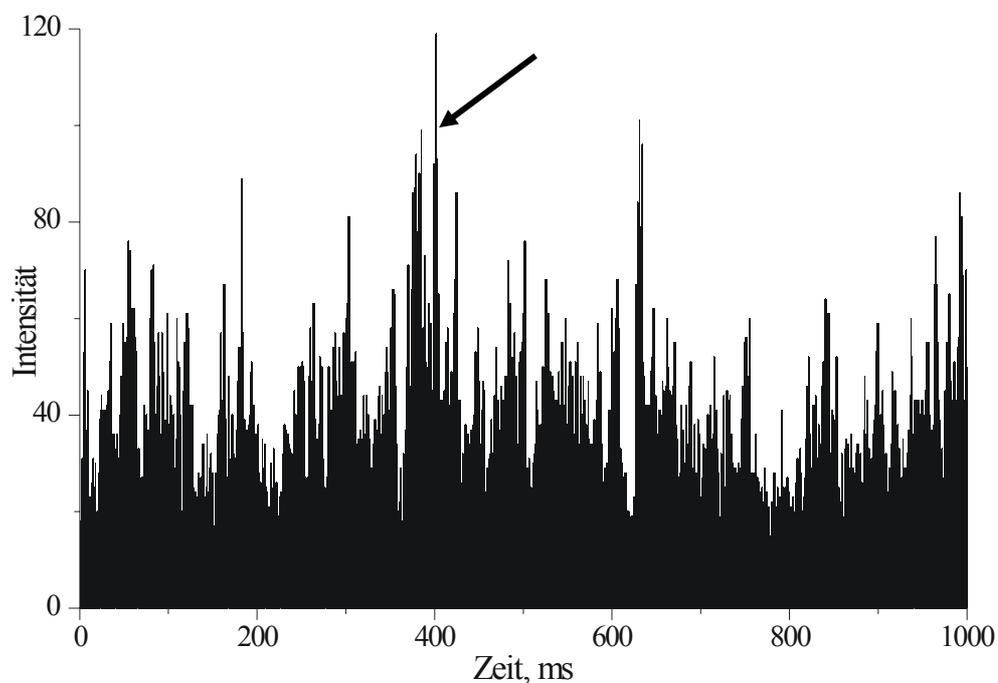


Abbildung 16: MCS-Spur von JA22 in Ethylenglykol, $c(\text{JA22}) = 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$,

im Bild ist ein Peak markiert, der mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Emission eines einzelnen Moleküls zurückzuführen ist.

Wird die Farbstoffkonzentration um einen Faktor Hundert verringert (Abbildung 16), so weist die MCS-Spur eine deutliche Strukturierung auf. Insbesondere treten immer wieder Peaks auf, die auf die Emission individueller Moleküle zurückzuführen sind (in Abbildung 16 markiert). Aufgrund der verhältnismäßig hohen Konzentration überlagern sich die Peaks jedoch, daher lassen sich unter diesen Bedingungen individuelle Moleküle nicht studieren.

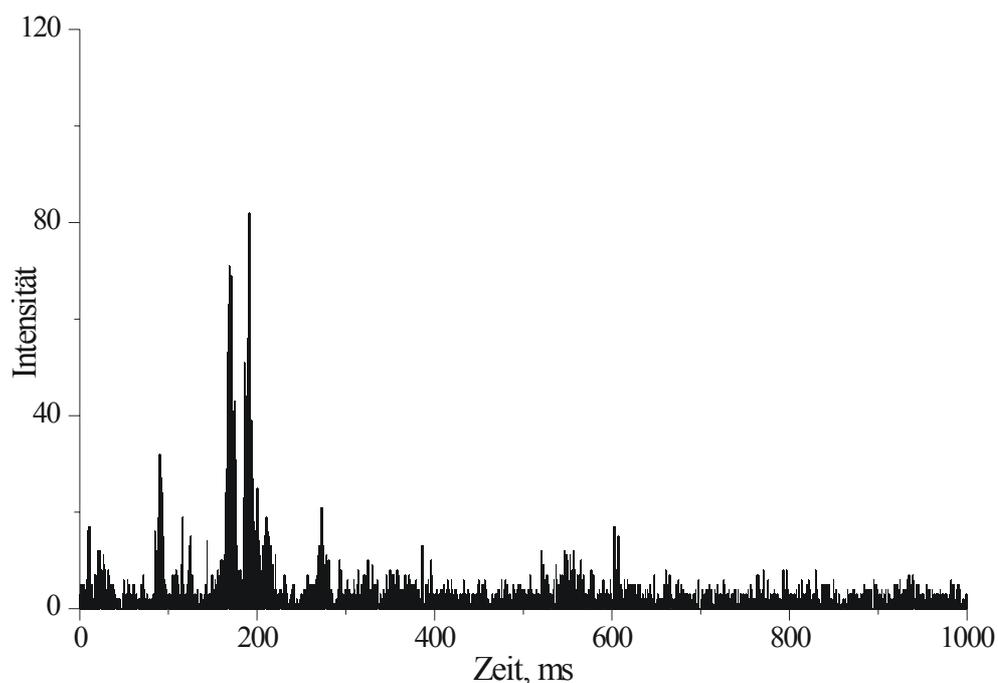


Abbildung 17: MCS-Spur von JA22 in Ethylenglykol, $c(\text{JA22}) = 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$

Wird die Farbstoffkonzentration noch einmal um einen Faktor Hundert ($10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$) verringert, so sind nur wenige, deutlich voneinander separierte Peaks zu erkennen (Abbildung 17) und es ist ersichtlich, dass bei dieser Konzentration das Verhalten individueller Moleküle studiert werden kann.

2.5.2 Reinheit des Lösungsmittels für Messungen auf Einzelmolekül-Niveau

Die Einzelmoleküldetektion kann durch fluoreszierende Verunreinigungen im Lösungsmittel erheblich gestört werden. Aus diesem Grund ist es erforderlich, hochgradig gereinigte Lösungsmittel zu verwenden, worauf bei den Einzelmolekül-Experimenten dieser Arbeit stets geachtet wurde. So wurde als Grundlage der Lösungsmittelgemische vakuumdestilliertes Ethylenglykol und tridestilliertes Wasser eingesetzt. Dabei verdeutlichen die Abbildungen 18 und 19, dass mit der durchgeführten Reinigung der Lösungsmittel gute Ergebnisse erzielt wurden, was daran zu erkennen ist, dass während der abgebildeten Intervalle von einer Sekunde kein einziges Einzelmolekülsignal registriert wird und der Untergrund im Bereich von wenigen kHz liegt.

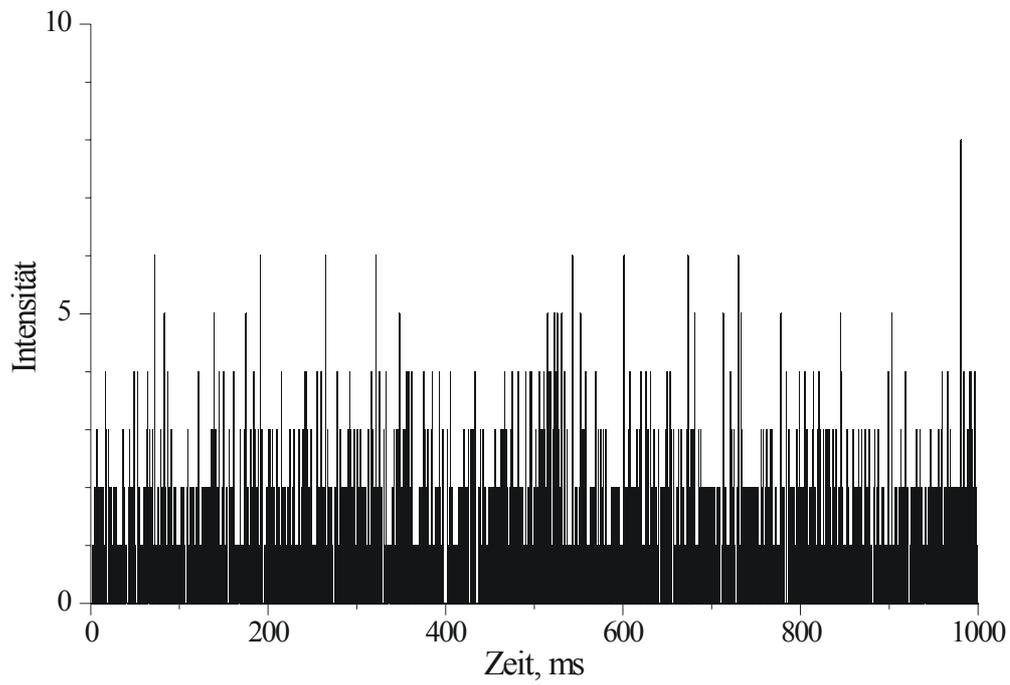


Abbildung 18: MCS-Spur von Ethylenglykol

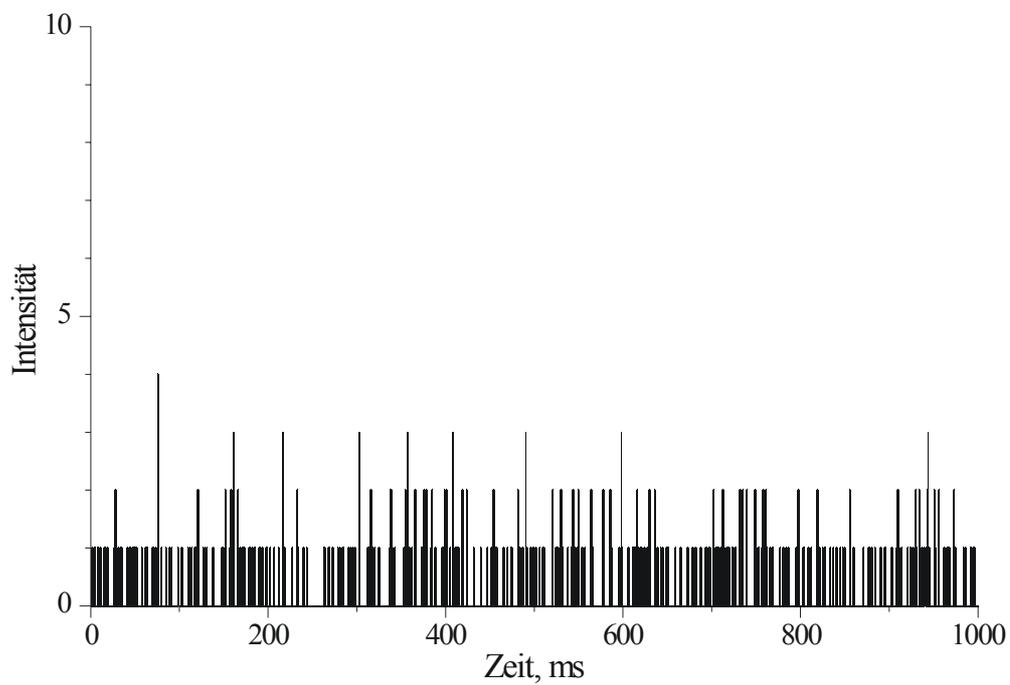


Abbildung 19: MCS-Spur von gereinigtem Wasser

2.6 Zusammenfassung

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Probleme bei der Einzelmoleküldetektion diskutiert. Insbesondere wurde auf die Problematik des Untergrundsignals eingegangen. Im weiteren wurden die Methodik und einige experimentelle Aufbauten sowie die Komponenten zur Einzelmoleküldetektion und der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie beschrieben. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Anregungslichtquelle, ihre Eigenschaften und das Detektionsvolumen, welches sich aus dem Fokus der Anregungsquelle ergibt, gelegt. Im Hinblick auf die im folgenden Kapitel beschriebenen Experimente, wurden auch die Diffusionseigenschaften einiger Fluoreszenzfarbstoffe untersucht. In diesem Zusammenhang wurden die Diffusionskoeffizienten D der Farbstoffe JA33 ($D = 2,09 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{ms}^{-1}$), HIDCI ($D = 1,61 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{ms}^{-1}$), JA22E ($D = 1,31 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{ms}^{-1}$) und JA34 ($D = 0,65 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{ms}^{-1}$) in Ethylenglykol bestimmt.

3 Elektrophorese als Trennmethode unterschiedlicher Analyten einer Probe

3.1 Allgemeines

Die Trennung unterschiedlicher Analyten kann auf verschiedene Weise erfolgen. Als moderne Trenntechniken gelten die Gaschromatographie GC, die Hochleistungsflüssigchromatographie HPLC sowie die Elektrophorese. Bei der Gaschromatographie können nur Analyten getrennt werden, die sich in die Gasphase überführen lassen und wird daher im Weiteren nicht näher betrachtet. Mit der Hochleistungsflüssigchromatographie lassen sich Analyte trennen, die in gelöster Form vorliegen. Dabei stellt die HPLC ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probe wird die Flüssigkeitschromatographie in folgende Trennmechanismen unterteilt: Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ausschluss- und Affinitätschromatographie. Die Trenntechnik der Elektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Beweglichkeit (Mobilität) der verschiedenen Analyten im elektrischen Feld. Der wesentliche Unterschied zwischen Elektrophorese und der HPLC bzw. der GC ist, dass bei der Elektrophorese die unterschiedlichen Beweglichkeiten innerhalb einer Phase zur Trennung von Analyten führt, hingegen beruht bei der HPLC bzw. der GC die Trennung aufgrund der unterschiedlichen Verteilung zwischen zwei Phasen, der mobilen und der stationären Phase.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Auftrennung von geladenen Fluoreszenzanalyten im elektrischen Feld. Aus diesem Grund wird im Folgenden detailliert auf die Trennmethodik bei der Elektrophorese eingegangen, insbesondere wird dabei der Schwerpunkt auf die Kapillarelektrophorese gelegt.

3.2 Elektrophoretische Verfahren

3.2.1 Allgemeines

Die Entdeckung des Phänomens der Elektrophorese wird Reuss [38] zugeschrieben. Seine 1809 veröffentlichte Arbeit enthält einen Versuch, bei dem die Schenkel eines mit nassem Sand gefüllten U-Rohres an ein galvanisches Element angeschlossen wurden. An der positiven Seite entstand infolge der Wanderung der feinen Sandteilchen oberhalb der Sandschicht eine Trübung der ursprünglich klaren Wasserschicht. Die Weiterentwicklung der

Elektrophorese erfolgte in zwei verschiedene Richtungen. Zum einen wurde die trägerfreie Elektrophorese, die Wanderung geladener Partikel frei in einer Lösung von Picton und Lindner [39], zum anderen wurde die Träger-Elektrophorese an einen Träger, z. B. Gel gebundene Elektrophorese [40, 41] entwickelt. Durch die Bemühungen von Tiselius [42] wurde die Elektrophorese zu einer allgemein verbreiteten analytischen Methode. Der große Nachteil der starken Entwicklung der Joule'schen Wärme bei der von Tiselius entwickelten Elektrophorese-Apparatur wurde durch die von Smithies [41] entwickelten Gelelektrophorese minimiert. Als sehr leistungsfähig erwiesen sich die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) [43] und die Agarosegelelektrophorese [44]. In den folgenden Jahren wurde die Elektrophorese in Kapillaren mit Innendurchmessern bis 500 μm entwickelt [45, 46]. Erst Mikkers [47] und Jorgenson [48] verwendeten Kapillarsäulen mit Innendurchmesser von weniger als 200 μm . Der Einsatz von Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser unter 100 μm ermöglicht die heute weit verbreitete on-line UV-Detektion [49], da Quarz im unteren UV-Bereich transparent ist.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von gelösten Teilchen in dispergierter oder kolloidaler Flüssigkeit im elektrischen Feld. Entsprechend der unterschiedlichen Wanderrichtung von Molekülen im elektrischen Feld wird unterschieden in Kataphorese, bei der die Partikel mit positiver Ladung zur Kathode wandern, und der Anaphorese. Hierbei wandern die negativ geladenen Ionen zur Anode. Maßgebend für die Trenneffizienz ist die unterschiedliche Wandergeschwindigkeit der Analytmoleküle. Dabei nehmen Parameter wie Größe, Form, Masse und Anzahl der Ladungen der Teilchen sowie pH-Wert, Temperatur und Viskosität des Trennmediums und die angelegte Feldstärke einen Einfluss auf das Trennverhalten unterschiedlicher Analyte. Die Trennung der unterschiedlichen Analytmoleküle erfolgt im Trennmedium innerhalb der Kapillare durch Anlegen des elektrischen Feldes. Bei einer homogenen Verteilung der Ionen innerhalb der Kapillare kann zwischen der angelegten Spannung U und dem elektrischen Feld E ein linearer Zusammenhang angenommen werden. Der lineare Zusammenhang gilt aber nicht nur in der Kapillarelektrophorese, sondern wird auch bei der Papier- und Gelelektrophorese verwendet. Bei der Kapillarelektrophorese ist der Spannungsabfall im Wesentlichen auf die Kapillare beschränkt, daher kann hier der Proportionalitätsfaktor zwischen elektrischem Feld und angelegter Spannung mit der Kapillarlänge L_{ges} gleichgesetzt werden. Diese Vereinfachung ist zulässig, da der elektrische Widerstand durch den geringen Kapillarquerschnitt hier um mehrere Größenordnungen höher ist als der elektrische Widerstand in den Pufferreservoirs.

Befindet sich ein geladenes Molekül in einem elektrischen Feld E , so wirkt auf dieses eine elektrische Kraft F_E . Dabei ist die auftretende Kraft proportional zur effektiven Ladung z des Moleküls:

$$F_E = \frac{z \cdot F_A}{N_A} \cdot E, \quad (12)$$

hier steht F_A für die Faradaykonstante und N_A für die Avogadrozahl. Auf Grund der resultierenden Kraft werden die geladenen Moleküle in der Probe so lange beschleunigt, bis die Reibungskraft F_R genauso groß ist wie die elektrische Kraft F_E . Dieser Beschleunigungsvorgang erfolgt innerhalb einer sehr kurzen Zeit und kann daher in den meisten Fällen vernachlässigt werden. Die Reibungskraft kann mit Hilfe des Stokes'schen Gesetzes erster Näherung abgeschätzt werden:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u, \quad (13)$$

wobei η die dynamische Viskosität, r der Stokes'sche Radius des Ions, welcher auch die Solvathülle beinhaltet, und u die Wanderungsgeschwindigkeit des Ions darstellt. Aus dem Gleichgewicht kann somit die Wanderungsgeschwindigkeit im stationären Zustand bestimmt werden.

$$u = \frac{z \cdot F_A \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N_A}, \quad (14)$$

wie zu erkennen ist, ist die Geschwindigkeit u proportional zum elektrischen Feld und damit zur angelegten Spannung U . Da alle weiteren Größen Materialkonstanten des jeweiligen Moleküls bzw. Ions und des umgebenden Lösungsmittels sind, ist es üblich, als charakteristische Größe für das Teilchen die elektrophoretische Beweglichkeit oder Mobilität μ anzugeben

$$u = \mu \cdot E. \quad (15)$$

Wie bereits erwähnt, ist eine Trennung unterschiedlicher Analytmoleküle nur möglich, wenn sich diese in ihrer Mobilität unterscheiden.

In der Praxis ist eine direkte Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeit aus den puffer- und molekülspezifischen Größen kaum möglich, da der Stokes'sche Radius in der Regel nicht genau bekannt ist. Des Weiteren besteht die Schwierigkeit, die effektive Ladung eines Moleküls aufgrund der umgebenden Solvathülle zu bestimmen. Die Stabilität der Solvathülle

ist abhängig von der Teilchengröße der gelösten Moleküle und deren Ladungsverteilung. Überdies kann es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen kommen, was die Solvathülle beeinflusst. Aus diesem Grund wird in der Praxis, wie auch in dieser Arbeit, die Geschwindigkeit eines Ions und damit dessen Mobilität bestimmt, indem eine zurückgelegte Weglänge Δs durch die dafür benötigte Zeit Δt dividiert wird.

3.2.2 Kapillarelektrophorese

3.2.2.1 Allgemeines

Neben der Papier- und Gelelektrophorese ist die Kapillarelektrophorese ein spezielles Verfahren, bei dem eine mit Elektrolyt gefüllte Kapillare eingesetzt wird. Unter dem Begriff Kapillarelektrophorese werden verschiedene Trenntechniken zusammengefasst. Aufgrund der Analyteigenschaften wird zwischen Kapillarzonenelektrophorese (CZE), Kapillargelelektrophorese (CGE), Chiraler Kapillarelektrophorese (CCE), isoelektrischer Fokussierung (IEF), Mizellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) und als älteste Kapillartrenntechnik die Isotachophorese (ITP) unterschieden. In der nachfolgenden Tabelle sind für unterschiedliche Analyte das jeweilige Trennverfahren aufgeführt.

Tabelle 3: Trennverfahren in der Kapillarelektrophorese

| Trennverfahren | Analyt-Eigenschaften |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|
| Kapillarzonenelektrophorese, CZE | Ionen |
| Kapillargelelektrophorese, CGE | DNA/ RNA |
| Chirale Kapillarelektrophorese, CCE | Chirale Moleküle |
| Isoelektrische Fokussierung, IEF | Proteine; Peptide |
| Mizellare elektrokinetische Chromatographie, MEKC | Neutrale, ionische Moleküle |
| Isotachophorese, ITP | Proteine, Ionen |

Um bei der Kapillarzonenelektrophorese eine Trennung von Analyten zu erzielen, werden die Mobilitätsdifferenzen der unterschiedlichen Moleküle ausgenutzt. Dabei zeichnet sich die Kapillarzonenelektrophorese durch eine geringe Probenmenge (1 – 100 nL), eine hohe Auflösung, eine sehr kurze Dauer (im Minutenbereich) und eine relativ einfache Automatisierbarkeit aus [50].

In der nachfolgenden Abbildung ist der prinzipielle Aufbau einer Apparatur zur Kapillarelektrophorese schematisch dargestellt. Dieser besteht aus der eigentlichen Kapillare, deren Innendurchmesser zwischen 2 bis 200 μm betragen kann und eine Länge von bis zu

mehreren Dezimetern besitzt. Ferner werden ein Proben- und Puffergefäß sowie eine Spannungsquelle mit Elektroden in den Proben- bzw. Puffergefäßen verwendet.

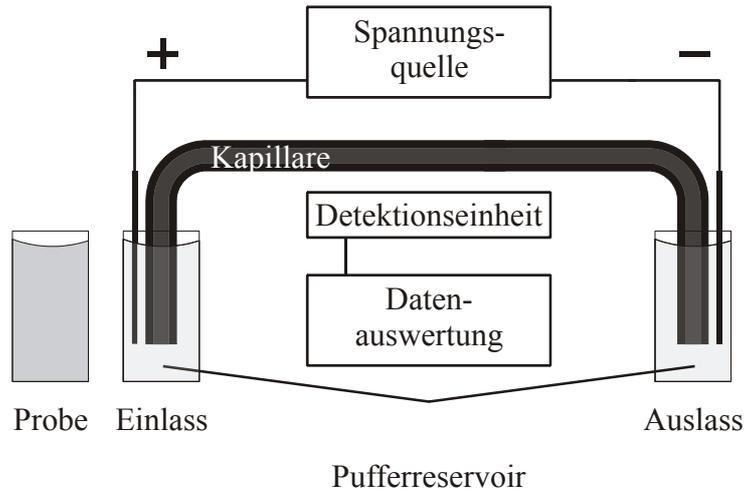


Abbildung 20: Schematischer Aufbau einer Apparatur zur Kapillarelektrophorese

Typischerweise beginnt ein Experiment mit der Injektion der Probe in die mit einem Elektrolyten gefüllte Kapillare, wobei auf diesen Vorgang noch detailliert in Kap. 3.2.2.3 eingegangen wird. Nach der Injektion ist ein äußeres elektrisches Feld anzulegen und die Zeitmessung zu starten. Nach einem Zeitintervall, das von der Stärke des elektrischen Feldes, den geometrischen Eigenschaften der Kapillare und der Mobilität der Probe-Ionen abhängt, erreichen die Analytmoleküle die Detektionseinheit. Dabei wird in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenz als Beobachtungsgröße für die Ankunft der Analyte im Detektionsbereich gewählt.

Üblicherweise besteht die Kapillare aus amorphen Siliciumdioxid (fused silica). Neben diesem Kapillarmaterial lässt sich auch Glas oder Kunststoff verwenden. Diese Materialien besitzen jedoch im kurzwelligen Spektralbereich nicht immer eine ausreichend hohe Transparenz um eine effektive Anregung zu gewährleisten [51]. Zur mechanischen Stabilisierung sind die Kapillaren typischerweise mit einer Polyimidschicht ummantelt. Aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz dieser Schicht sollte diese jedoch im Detektionsbereich entfernt werden.

Aus den Abmessungen der Kapillaren kann deren Innenvolumen und Oberfläche berechnet werden. Die in Tabelle 4 aufgeführten Werte sind typisch für kommerziell erhältliche Kapillaren und beziehen sich auf eine Kapillarlänge von einem Meter.

Tabelle 4: Kenngrößen von Kapillaren; ID: Kapillarinne Durchmesser, V: Volumen, O: Oberfläche; Die Angaben beziehen sich auf eine Kapillarlänge von 1 m.

| $I_D, \mu\text{m}$ | $V, \mu\text{l}$ | O, mm^2 | $O/V, \text{mm}^{-1}$ |
|--------------------|----------------------|------------------|-----------------------|
| 2 | $3,1 \times 10^{-3}$ | 6,3 | 2000 |
| 5 | $2,0 \times 10^{-2}$ | 15,7 | 800 |
| 10 | $7,9 \times 10^{-2}$ | 31,4 | 400 |
| 50 | 2,0 | 157,1 | 80 |
| 100 | 7,9 | 314,2 | 40 |
| 200 | 31,0 | 628,3 | 20 |
| 250 | 49,0 | 785,4 | 16 |

Für die Auftrennung von Analyten ist ein geringer Kapillarradius vorteilhaft, da hierdurch die Zahl der Wandstöße bzw. die Adsorption an der Kapillarwandung hoch ist. Andererseits ist das Verhältnis von Kapillaroberfläche zum -volumen ein Parameter, der beim Wärmeabtransport und bei chromatographischen Adsorptionsphänomenen während der Elektrophorese eine wesentliche Rolle spielt.

3.2.2.2 Physiko-chemische Effekte in Kapillaren

Normalerweise ist die Oberfläche von Kapillaren nicht inert. Aufgrund der negativ geladenen Silanolgruppen des Quarzes können besonders positiv geladene Analytmoleküle an der Wand adsorbieren. Unter alkalischen und neutralen Trennbedingungen sind besonders viele Silanolgruppen deprotoniert und erleichtern die Adsorption von positiven Analyten an der Oberfläche. Durch die Adsorption wird das ζ -Potential, welches sich als Folge der Oberflächenladung des Quarzes ausbildet, verändert. Als direkte Konsequenz kommt es zu einer Variation der Mobilität des elektroosmotischen Flusses, wodurch die Migrationszeit aller Analyten beeinflusst wird [52].

Elektroosmotischer Fluss / Zeta-Potential

Aufgrund der Dissoziation der Silanolgruppen entstehen bei puffergefüllten Quarzkapillaren negative Ladungen an der Kapillaroberfläche (siehe Abbildung 21). Hierdurch werden durch den Puffer positive Gegenladungen in die Nähe der Wandung induziert, die in einem elektrischen Feld zu einem Materialfluss führen, den so genannten Elektroosmotischen Fluss (EOF). Dieser trägt aktiv zum Transport, aber nicht zur Trennung von Analyten bei. Naturgemäß hängt der EOF stark vom pH-Wert des Puffers und von den Oberflächeneigenschaften der Kapillare ab.

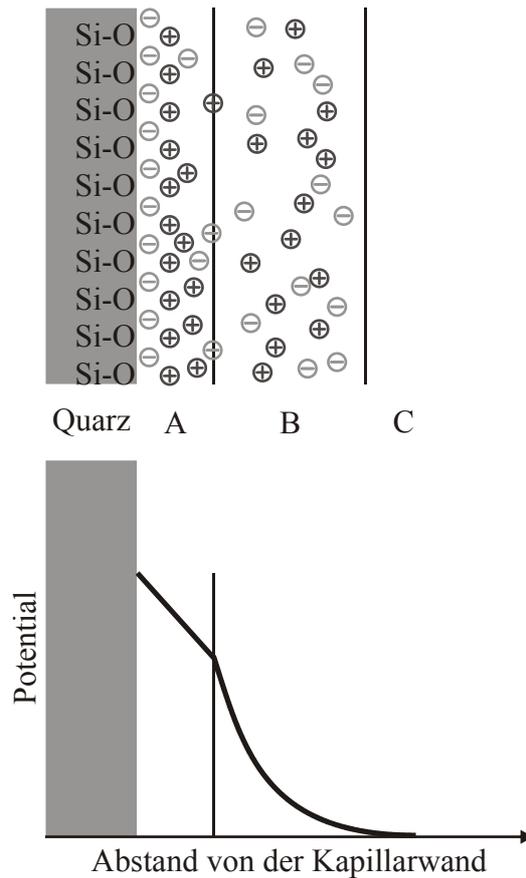


Abbildung 21: Ladungsverteilung an der Oberfläche der Kapillare und Ausbildung des ζ -Potentials

A: starre Grenzschicht mit adsorbierten Ionen, B: Stern-Grenzschicht (diffuse Grenzschicht), C: Elektrolyt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit u des EOF lässt sich vereinfacht mit Hilfe der Helmholtz-Gleichung beschreiben.

$$u_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta}, \quad (16)$$

dabei ist ε die dielektrische Konstante des Elektrolyten, E die angelegte Feldstärke, ζ das Zeta-Potential und η die Viskosität des Puffers. Für pH-Werte zwischen 3 und 8 liegen die Werte der Mobilität μ_{EOF} in Kapillaren im Bereich zwischen $0,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 (\text{V s})^{-1}$ und $6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 (\text{V s})^{-1}$ [53]. Da es sich um positive Ladungsströme handelt, bewegt sich der EOF zur Kathode. Bedingt durch den Umstand, dass bei zunehmendem pH-Wert die Zahl der negativen Ladungsträger ansteigt, ist die Kompensierung der Oberflächenladung der Kapillare durch den Elektrolyten beeinträchtigt, was dazu führt, dass der elektroosmotische Fluss größer wird. Der EOF überlagert jede elektrophoretische Wanderung, kann aber durch Variation des Puffers alkalisches oder saures Anätzen der Kapillarwandung (Kapillarkonditionierung, Derivatisierung oder Beschichtung der Oberfläche) so beeinflusst werden, dass seine Wirkung verringert wird.

Einfluss des Puffers

Wie bereits dargestellt, sind elektrophoretische Trennungen nur dann möglich, wenn sich die verschiedenen Analyten einer Probe in ihrer Mobilität unterscheiden. Um einen Überblick über die Größenordnung der Mobilitäten zu geben, sind in Tabelle 5 die Grenzmobilitäten einiger Ionen aufgeführt.

Tabelle 5: Grenzmobilitäten einiger Ionen bei 25 °C

| Kationen | Mobilität, μ $10^{-5} \text{ cm}^2 (\text{V s})^{-1}$ | Anionen | Mobilität, μ $10^{-5} \text{ cm}^2 (\text{V s})^{-1}$ |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| H ₃ O ⁺ | 362,5 | OH ⁻ | -205,5 |
| Li ⁺ | 40,1 | F ⁻ | -57,4 |
| Na ⁺ | 51,9 | Cl ⁻ | -79,1 |
| K ⁺ | 76,1 | NO ₃ ⁻ | -74,1 |
| NH ₄ ⁺ | 72,2 | SO ₄ ²⁻ | -82,9 |

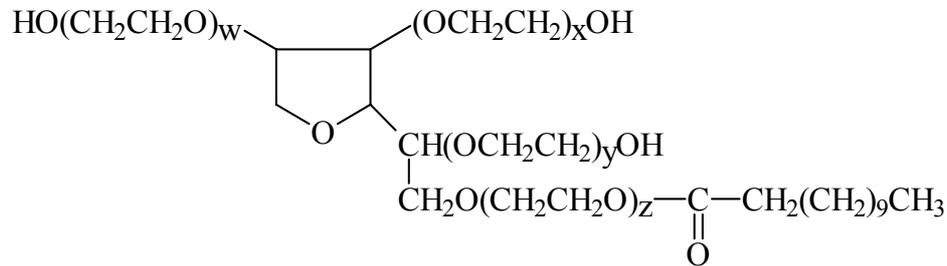
Werden die Grenzmobilitäten der Ionen aus Tabelle 5 mit der Mobilität durch den EOF verglichen, wird offensichtlich, dass die Mobilitäten μ der Ionen um ein bis zwei Größenordnungen größer sind als die Mobilität μ_{EOF} . In dieser Arbeit wird im Wesentlichen Natriumchlorid als Leitsalz eingesetzt. Die Natrium-Ionen haben eine Grenzmobilität von etwa $52 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 (\text{V s})^{-1}$, demgegenüber haben die Chlorid-Ionen eine Grenzmobilität von $79 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 (\text{V s})^{-1}$. Hieraus würde sich ein Fluss zur Anode ergeben, der sich aber in der Praxis als nicht störend erwiesen hat.

Kapillarkonditionierung

Wie oben beschrieben, befinden sich an der Oberfläche von unbehandelten Quarzkapillaren Ladungsträger. Durch eine inhomogene Ladungsträgerverteilung können in der Kapillare Inhomogenitäten im elektrischen Feld entstehen. In der Absicht, diese Inhomogenitäten zu vermeiden, sind die Ladungsträger zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden die Kapillaren in der vorliegenden Arbeit vor den Messungen konditioniert. Hierzu wurden diese zunächst mehrere Minuten mit tridestilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Kapillaren mit 1,0 M Natronlauge und danach mit einer 0,1 M Natronlauge behandelt. Abschließend wurden die Kapillaren für mehrere Minuten mit dem späteren Trennmedium befüllt.

Alternativ kann die Oberfläche einer Quarzkapillare auch modifiziert werden, indem der Pufferlösung ein Detergenz zugesetzt wird. Hier hat sich u. a. Tween 20 (Abbildung 22)

bewährt, da es bevorzugt von den Oberflächensilanolgruppen adsorbiert wird. Durch diesen Vorgang bildet sich eine Schicht aus, die den EOF unterdrückt und darüber hinaus die Adsorption durch hydrophobe oder elektrostatische Abstoßung vermindert [54].



$$w + x + y + z = 20$$

Abbildung 22: Chemische Struktur von Tween 20

Silanisierung

Neben den beiden zuvor beschriebenen Möglichkeiten kann eine Beschichtung der Oberflächen auch mittels Silanisierung erfolgen. Hierbei findet eine Reaktion zwischen den Silanolgruppen der Kapillaroberfläche und einem Organosilan statt, wobei das Organosilan vorzugsweise eine hydrolysierbare funktionelle Gruppe tragen sollte, so dass eine Hydrolyse stattfinden kann. Als ein für diese Zwecke geeignetes Silan hat sich z. B. Dichlordimethylsilan erwiesen.

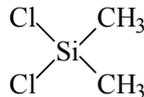


Abbildung 23: Chemische Struktur von Dichlordimethylsilan

Für den Bildungsmechanismus der Silane wird angenommen, dass vor der eigentlichen Reaktion eine Hydrolyse des Silans stattfindet. Im Anschluss erfolgt die Kondensation der durch Wasserstoffbrücken gebundenen Silane. Um eine vollständige Bindung der möglichen Siloxanbindungen zur Oberfläche sicherzustellen, wird besonders bei Alkoxysilanen von manchen Autoren bei erhöhter Temperatur gearbeitet [55]. Chlorsilane weisen gegenüber Alkoxysilanen eine erhöhte Reaktivität auf, so dass eine erhöhte Temperatur zumeist nicht erforderlich ist [56].

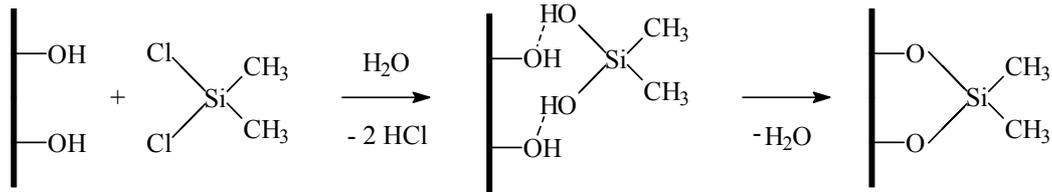


Abbildung 24: Reaktionsschema zur Grenzflächenfunktionalisierung mit Silanen

Die Silanisierung von Kapillaren führt dazu, dass eine hydrophobe Schicht auf die Kapillarwandung aufgetragen wird. In Vorversuchen zeigte sich bei sehr kleinen Kapillarinneendurchmessern von etwa 5 μm , dass sich die hydrophobisierte Kapillare nur unzureichend mit wässrigen Lösungen befüllen lässt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit Tween 20 zur Kapillarbeschichtung eingesetzt. Das Detergenz konnte direkt zum Elektrolyten mit in die Kapillare gegeben werden.

3.2.2.3 Injektionsmethoden von Analytmolekülen

Die Probenaufnahme in die Kapillare kann mittels einer hydrostatischen, hydrodynamischen oder elektrokinetischen Injektion erfolgen. Bei der hydrostatischen Injektion wird die Probe durch eine Höhendifferenz zwischen dem Probe- und Puffergefäß in die Kapillare gebracht. Durch den Siphoneffekt wird die Probelösung in die Kapillare gesaugt. Bei der hydrodynamischen Injektion wird die Probe mittels eines Druckunterschieds auf die Kapillare gegeben. Bei der elektrokinetischen Probenaufnahme werden Analytmoleküle durch Anlegen einer Spannung zur elektrophoretischen Wanderung getrieben und gelangen so in die Kapillare. Die dabei injizierte Anzahl N an Analytmolekülen ist bei diesem Injektionsverfahren von der Höhe der angelegten Spannung U_{Inj} , der Injektionszeit t_{Inj} und der Mobilität μ der Komponenten abhängig.

$$N = \frac{(\mu_{Analyt} + \mu_{EOF}) \cdot \pi \cdot r^2 \cdot U_{Inj} \cdot t_{Inj} \cdot c_{Analyt}}{L_{ges}} \cdot N_A, \quad (17)$$

wobei c_{Analyt} die Konzentration der Analytmoleküle und L_{ges} die Gesamtlänge und r den Radius der Kapillare darstellt.

Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die elektrokinetische Injektion verwendet. Ein Nachteil dieser Injektionsmethode liegt darin, dass bereits durch das Anlegen des elektrischen Feldes die Analytmoleküle mit hoher Mobilität bevorzugt in die Kapillare

injiziert werden. Analytmoleküle mit niedriger Mobilität können unter Umständen nicht auf die Kapillare aufgegeben werden und gelangen somit nicht zur Detektion.

3.3 Detektion individueller Moleküle in Kapillaren

3.3.1 Allgemeines

Bei den im Folgenden beschriebenen kapillarelektrophoretischen Experimenten wurden die in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffe HIDCI, JA22E, JA33 und JA34 als Analytmoleküle eingesetzt. Diese Wahl erfolgte, da diese Moleküle sich in ihrer Mobilität und Fluoreszenzabklingdauer unterscheiden. Ferner besitzen diese Farbstoffe eine ausreichende Überlappung ihrer Hauptabsorptionsbanden, um mit dem gleichen Lasersystem angeregt werden zu können.

3.3.2 Experimente zur Auftrennung und Detektion individueller Moleküle unter Zuhilfenahme der Elektrophorese in Kapillaren

Experimente auf Einzelmolekül-Niveau können grundsätzlich mit vergleichbaren Methoden durchgeführt werden, wie sie auch bei Ensemble-Messungen zum Einsatz kommen. Um unterschiedliche Molekülspezies in einer Lösung charakterisieren zu können, sollte zunächst eine Auftrennung der einzelnen Spezies erfolgen. Anschließend lassen sich die getrennten Komponenten unabhängig voneinander charakterisieren. Dies ist in der Analytik ein gängiges Verfahren und sollte sich auch auf die vorliegenden Experimente übertragen lassen. In dieser Absicht wurden geladene Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle kapillarelektrophoretisch getrennt und untersucht. Als experimenteller Aufbau diente dabei die in Abbildung 25 dargestellte Anordnung, die im Prinzip eine modifizierte Abwandlung des in Abbildung 20 beschriebenen Aufbaus ist.

Für die Anregung der Fluorophore wurde ein Diodenlaser eingesetzt, dessen Maximum der Emission bei 633 nm liegt. In der Absicht vom Lasersystem emittiertes Licht bei höheren Wellenlängen zu unterdrücken, wurde der Anregungslaserstrahl durch einen Bandpassfilter (EF) geleitet. Hinter dem Filter befanden sich zwei Zylinderlinsen (Zy1, Zy2), um das elliptische Strahlprofil des Diodenlasers in ein kreisförmiges Profil zu konvertieren. Mittels eines dichroitischen Strahlteilers (ST) wurde der Laserstrahl in das Mikroskop eingekoppelt und mit einem Ölimmersionsobjektiv (MO) in die Kapillare (K) fokussiert. Um Fremdlicht aus der Detektionseinheit fern zu halten, war der Detektionsbereich mit einem lichtdichten Gehäuse umgeben. Die Fluoreszenz der Analytmoleküle wurde durch das gleiche Objektiv

gesammelt und mit einer Linse (Li) auf ein Avalanche Photodioden-Modul fokussiert. Dieses Modul erzeugt für jedes detektierte Photon einen genormten elektrischen Impuls (TTL-Signal), der zur Auswerte-Elektronik weitergeleitet wurde. Zur Unterdrückung von elastisch gestreutem Anregungslicht (Rayleigh-Streuung) befand sich vor dem Detektor ein Bandpassfilter (FF). Um Streulicht zu unterdrücken, das seinen Ursprung außerhalb des Fokus hat, wurde eine Lochblende (L) vor dem Photodioden-Modul positioniert.

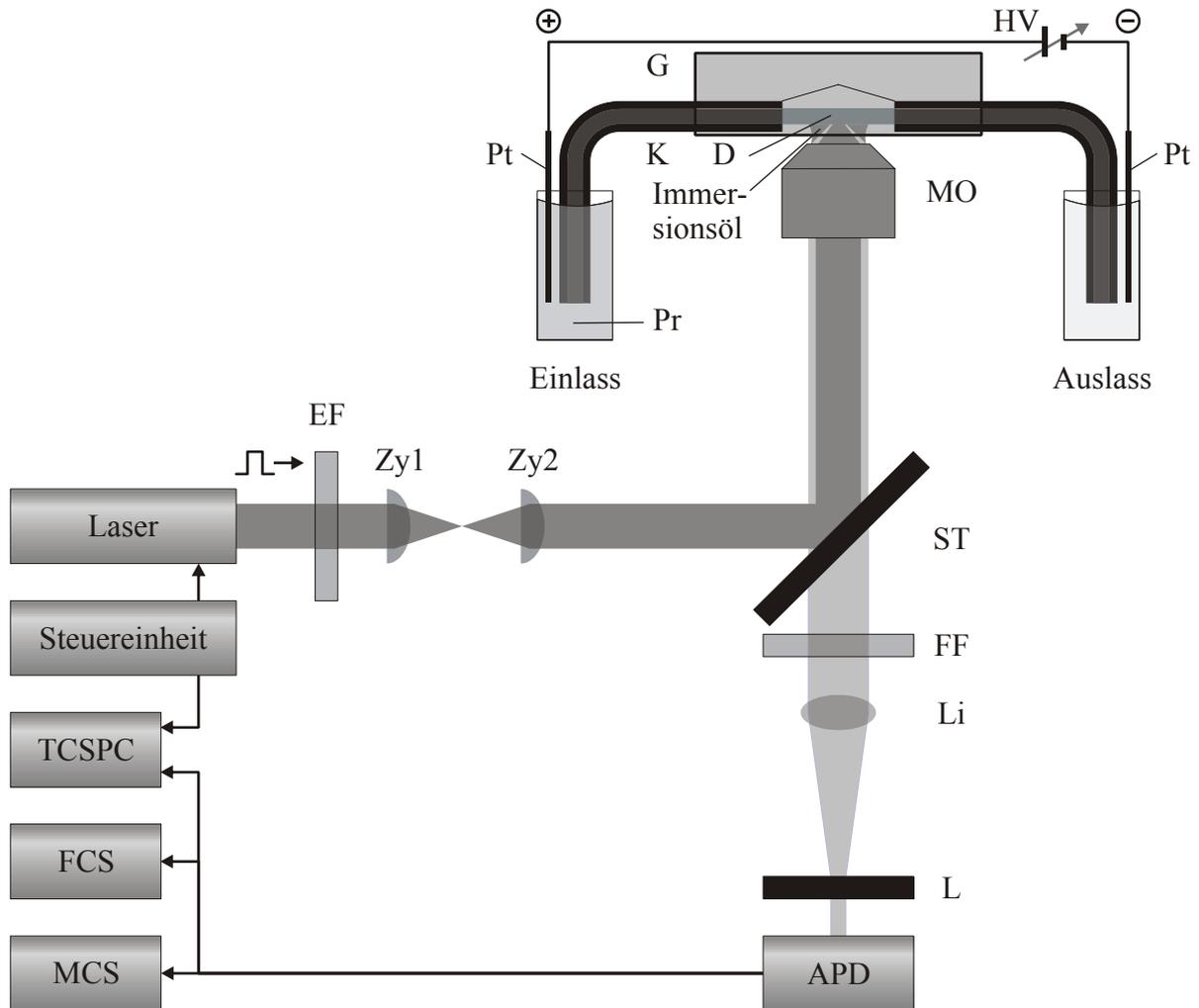


Abbildung 25: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus

D: Detektionsfenster, EF: Emissionsfilter, FF: Fluoreszenzfilter, G: lichtdichtes Gehäuse, HV: Hochspannungsversorgung, K: Kapillare, L: 100 μm Lochblende, Li: Sammellinse, MO: Mikroskop-Objektiv, Pr: Probe, Pt: Platin-Elektrode, ST: dichroitischer Strahlteiler, Zy1: Zylinderlinse 1, Zy2: Zylinderlinse 2, APD: Avalanche Photodiode, FCS: Fluoreszenzkorrelationsauswertung, Laser: gepulste Laserdiode mit Steuereinheit, MCS: Multichannel-Scaler-Einheit, TCSPC: Modul für die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung.

Die Apparatur für die Kapillarelektrophorese umfasste eine Hochspannungsversorgung (HV), deren Ausgänge mittels Platin-Elektroden mit dem Einlass- bzw. dem Auslassreservoir verbunden waren. Dabei enthielt das Einlassreservoir das Farbstoff-Puffer-Gemisch und das Auslassreservoir den reinen Puffer. Zwischen dem Ein- und Auslass befand sich die Kapillare, in dessen Mitte der Detektionsbereich lag. Zur Justage war die Kapillare auf einem

xyz-Linearverstärker montiert, wobei das Detektionsfenster so platziert wurde, dass der Fokus des Laserstrahls im Zentrum der Kapillare zu liegen kommt.

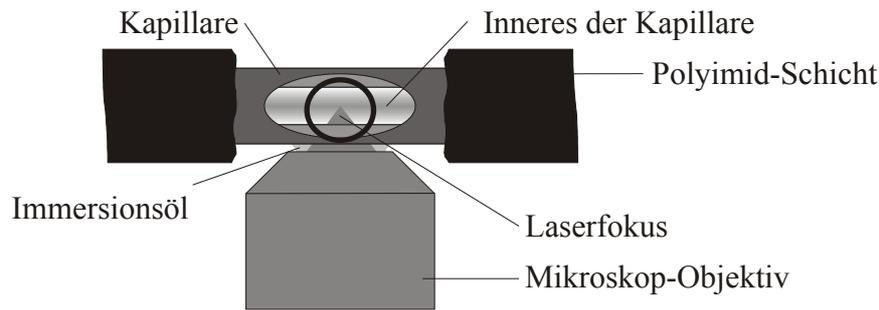


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Detektionseinheit

Die eingesetzten Kapillaren bestehen aus polyimidbeschichtetem Quarzglas. Um Fluoreszenz der Polyimidbeschichtung zu vermeiden, wurde diese im Detektionsbereich mit einer Flamme zersetzt und die dabei entstehende Rußschicht durch Aceton entfernt. Damit die Kapillare ausreichende Stabilität behielt, wurde der präparierte Detektionsbereich möglichst klein gewählt, wobei sich ein Bereich von etwa 10 mm als ausreichend erwies.

3.3.3 Migrationsgeschwindigkeit

Die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Zusammenhänge lassen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Migrationsgeschwindigkeit und dem angelegten elektrischen Feld erwarten. In der Absicht zu überprüfen, inwiefern die erwartete lineare Abhängigkeit auch in der Praxis besteht, wurde mit dem in Abbildung 25 dargestellten Aufbau ein Experiment zur Bestimmung der Mobilität durchgeführt. Gemäß den Gleichungen (16) und (17), sollte die elektrophoretische Mobilität in einem gegebenen Lösungsmittel eine Konstante sein. Aus diesem Grund wurde als Lösungsmittel bei den folgenden Untersuchungen stets die gleiche wässrige Pufferlösung mit pH 7,0 verwendet. Als Analytmolekül wurde für die Messungen der Fluoreszenzfarbstoff HIDCI eingesetzt. Vorbereitend wurde der Farbstoff zunächst ebenfalls in dem wässrigen Puffer mit pH 7,0 gelöst, wobei die Konzentration c dieser Lösung $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ betrug. Mittels einer elektrokinetischen Injektion wurde ein Teil der Farbstofflösung in die Kapillare injiziert, dabei betrug die Injektionszeit t_{inj} 5 Sekunden, bei einer Spannung U_{inj} von 2000 V. Um alle Experimente unter den gleichen Bedingungen durchzuführen, wurden stets Kapillaren mit gleichem Innendurchmesser I_D ($I_D = 50 \mu\text{m}$), gleicher Gesamtlänge L_{ges} ($L_{ges} = 15,35 \text{ cm}$) und gleicher effektiver Länge L_{eff} ($L_{eff} = 7,50 \text{ cm}$) gewählt. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 27 graphisch dargestellt und zeigt eindeutig eine Unabhängigkeit der Mobilität vom angelegten elektrischen Feld. Der sich

ergebende Mittelwert für die Mobilität von HIDCI im wässrigen Puffer beträgt $\mu = 3,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

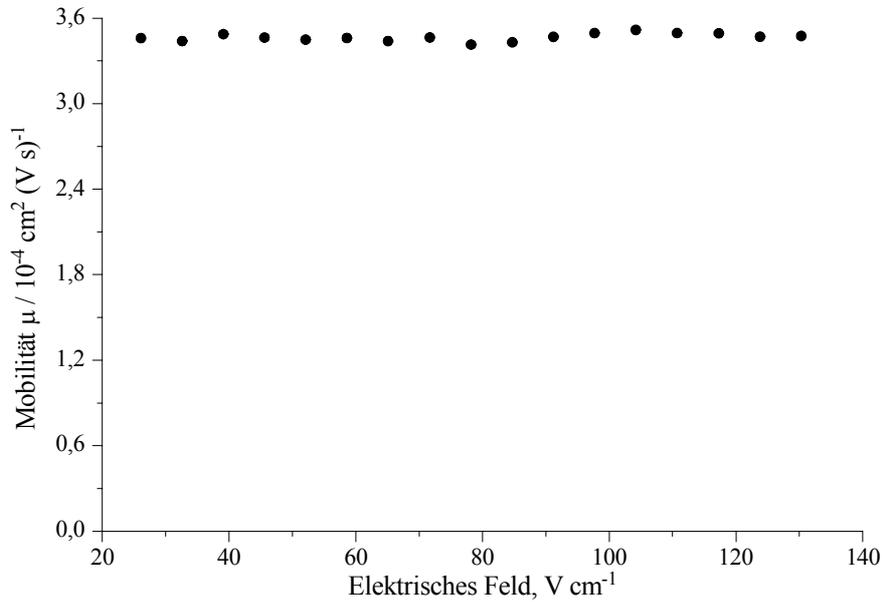


Abbildung 27: Mobilität des Farbstoffs HIDCI in Abhängigkeit vom elektrischen Feld

Bei den Experimenten zur Bestimmung der Mobilität konnte ein interessanter Effekt beobachtet werden. Dieser äußerte sich darin, dass die Peakbreite mit der Migrationszeit zunimmt. Um dies zu verdeutlichen, ist in der folgenden Abbildung jeweils ein Elektropherogramm mit kurzer bzw. mit langer Migrationszeit wiedergegeben.

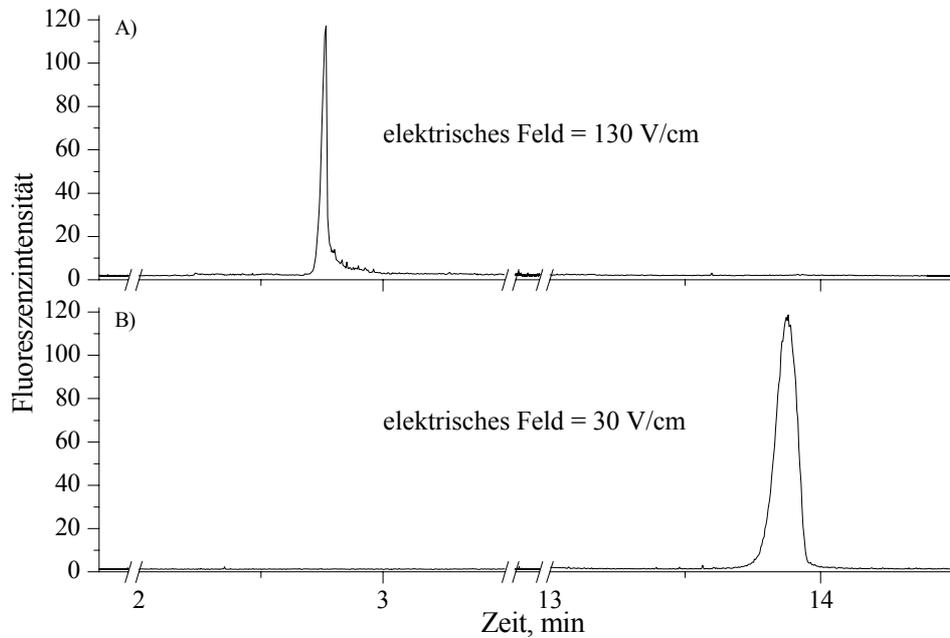


Abbildung 28: Abhängigkeit der Peakbreite von der Migrationszeit

Die Verbreiterung der Peaks wird im Wesentlichen nicht durch die Diffusion bestimmt. Dies kann dem Umstand entnommen werden, dass für einen eindimensionalen, diffusionskontrollierten Prozess sich eine Breite σ ergeben würde zu:

$$\sigma = (2 \cdot D \cdot t)^{1/2} \quad (18)$$

[57]. Ausgehend von der in Tabelle 2 angegebenen Diffusionskoeffizienten D von $1,61 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{ms}$ für den Farbstoff HIDCI würde sich damit nach einer Zeit von etwa 14 Minuten eine Verbreiterung von $\sigma = 0,16 \text{ mm}$ ergeben, was in Abbildung 28 einer Verbreiterung von weniger als einer Sekunde entspräche. Aus diesem Grund kann geschlossen werden, dass die Verbreiterung der Peaks wesentlich durch die Wechselwirkung mit der Kapillarwand bestimmt wird.

3.3.4 Kapillarelektrophoretische Probenauftrennung

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Strukturen ist zu erwarten, dass die Farbstoffe JA22 und JA33 eine verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit besitzen und sich trennen lassen. In der Absicht dies zu untersuchen, wurden Farbstoffgemische bestehend aus JA22 und JA33 hergestellt und in die Kapillare injiziert. Zunächst wurde eine Lösung mit JA33 Molekülen auf die Kapillare gegeben. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wanderte anschließend der Farbstoff durch die Kapillare, siehe Abbildung 29, A). Die Migrationszeit der Moleküle betrug bei diesem Experiment 7,7 Minuten. Im nächsten Experiment wurde eine Probelösung mit JA22 Molekülen in die Kapillare injiziert und wanderte nach Anlegen der gleichen Spannung wie zuvor durch die Kapillare, siehe Abbildung 29, B). In diesem Fall betrug die Migrationszeit der Moleküle 38,2 Minuten. Im darauf folgenden Versuch wurde aus den beiden Probelösungen JA22 und JA33 ein Gemisch zu gleichen Teilen hergestellt und auf die Kapillare gegeben. Nach dem Anlegen der gleichen Spannung wie bei den ersten Experimenten wurden zwei Peaks im Elektropherogramm detektiert, siehe Abbildung 29, C). $t_{m,1} = 7,5 \text{ Minuten}$, $t_{m,2} = 38,0 \text{ Minuten}$.

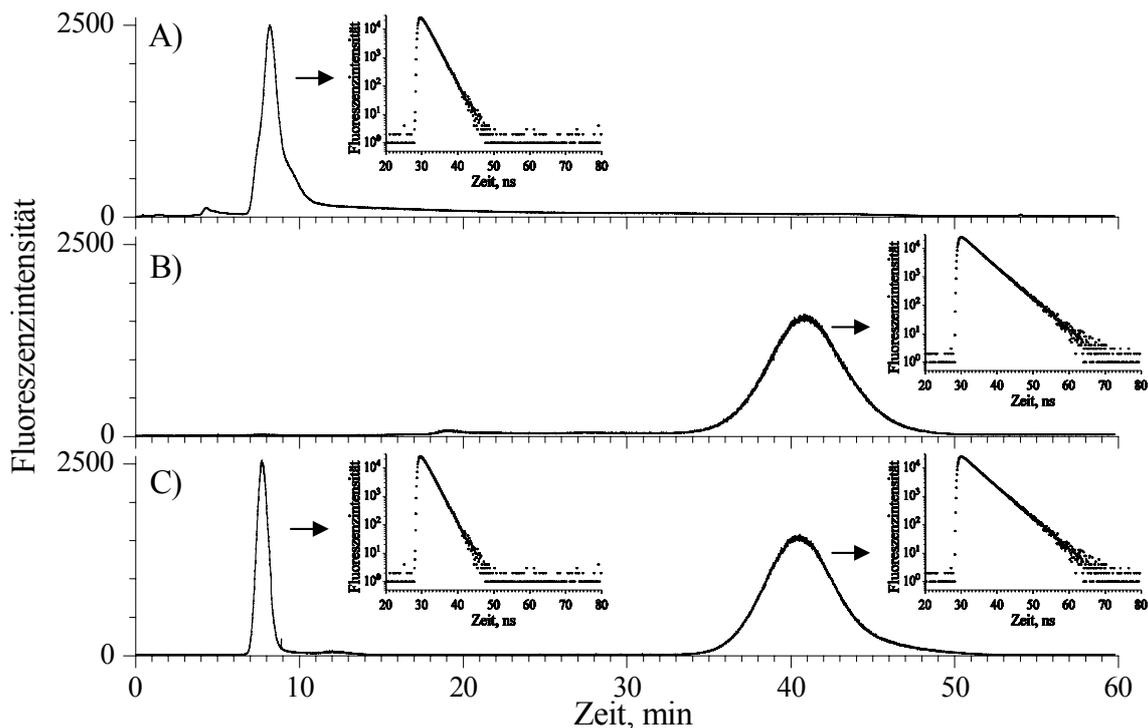


Abbildung 29: Elektropherogramme zur Trennung der Farbstoffe JA22 und JA33

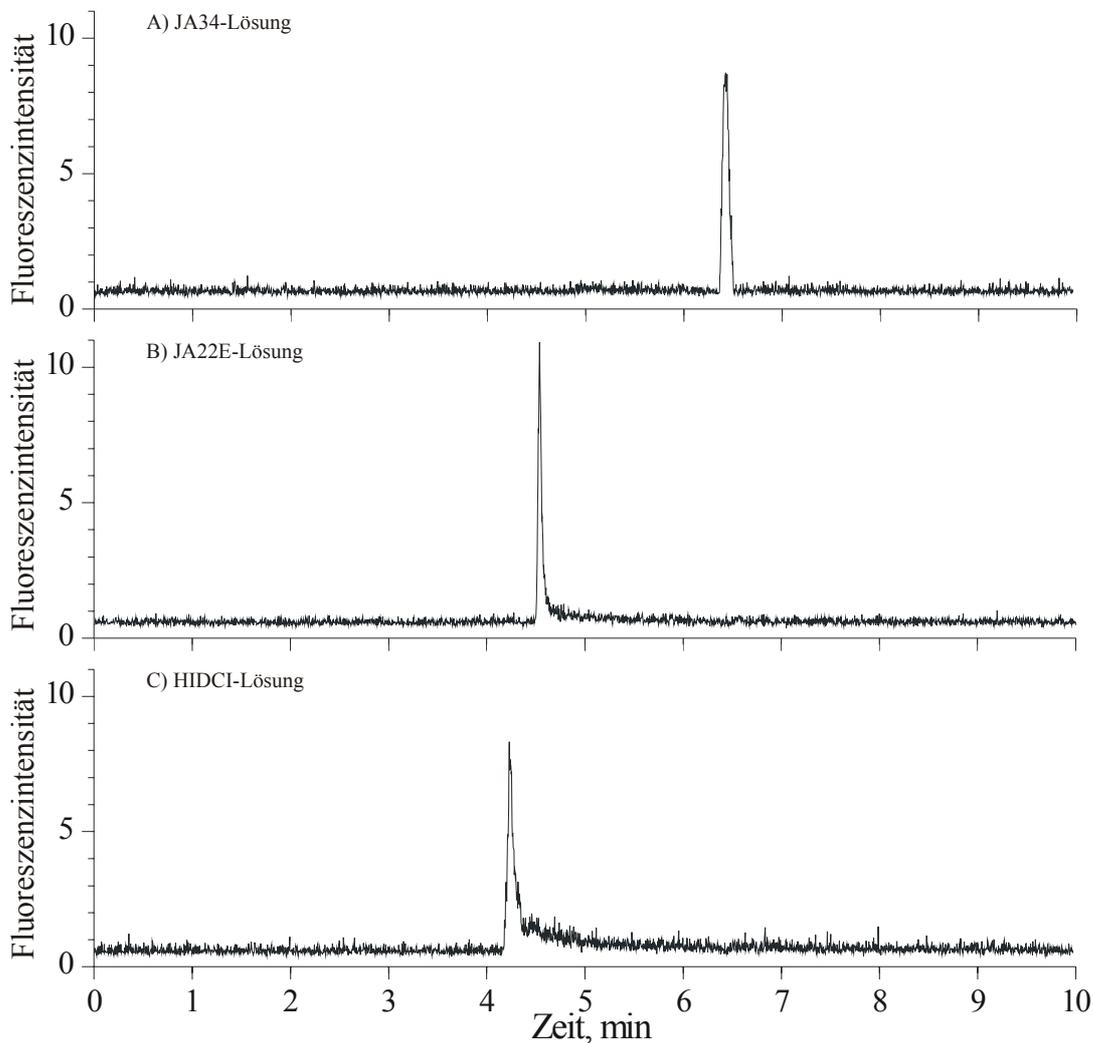
Farbstoffe: JA22, JA33; Konzentrationen: 10^{-8} M; Trennmedium: Ethylenglykol / NaCl-Lösung (0,2 %) / Tween20 / Trifluoressigsäure (73,9 / 25 / 1 / 0,1 %); $I_D = 200 \mu\text{m}$; Kapillarlänge: 15,0 cm; effektive Kapillarlänge: 7,3 cm; Injektionsspannung: 0 V; Injektionszeit: 5 s; Elektrophoresespannung: 10 kV; JA33-Peak: $t_m = 7,7$ Minuten, $\mu = 2,37 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\tau = 1,8$ ns; JA22-Peak: $t_m = 38,2$ Minuten, $\mu = 4,78 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\tau = 3,9$ ns.

Anhand der Elektropherogramme der einzelnen Probelösungen konnte eine Zuordnung der Peaks im Elektropherogramm des Gemisches vorgenommen werden. Der erste Peak resultierte aus der Fluoreszenz der JA33 Moleküle, der zweite resultierte aus der Fluoreszenz der JA22 Moleküle. Zur Erhärtung des Ergebnisses konnte mit der Apparatur parallel die Fluoreszenzabklingdauer der einzelnen Komponenten bestimmt werden, siehe Abbildung 25. Die Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven erfolgte im Bereich der entsprechenden Peaks. Die Abklingdauer des ersten Peaks im Elektropherogramm des Gemisches stimmte mit $\tau = 1,8$ ns mit der Abklingdauer des Farbstoffes JA33 überein. Die Abklingdauer des zweiten Peaks ergab sich zu $\tau = 3,9$ ns und stimmte mit der Abklingdauer des Farbstoffes JA22 überein. Durch die Bestimmung der Abklingdauer und der Migrationszeit konnten die einzelnen Komponenten des Gemisches eindeutig identifiziert werden. Es zeigte sich, dass eine Probenauftrennung mit Farbstoffkonzentrationen von $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ sehr gut möglich ist.

In der Absicht zu überprüfen, ob auch ein Probengemisch mit einer Konzentration von nur $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ aufgetrennt werden kann und ob sich dabei die einzelnen Komponenten immer noch identifizieren lassen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem vier verschiedene

Farbstoffe (HIDCI, JA22E, JA33, JA34) eingesetzt wurden. Zunächst wurden Elektropherogramme angefertigt, bei denen die Lösung jeweils nur eine Farbstoffspezies beinhaltet. Im Anschluss an diese Experimente wurde ein Gemisch aus gleichen Teilen der verschiedenen Probelösungen hergestellt und injiziert. Die Elektropherogramme sind in Abbildung 30 zusammengestellt.

Um eine Identifikation zu ermöglichen, wurde jeweils im Bereich des Maximums die Fluoreszenzabklingdauer bestimmt. Wie der Abbildung 30 entnommen werden kann, besteht die Möglichkeit auch bei diesen Proben die einzelnen Komponenten, sowohl anhand der Migrationszeit, als auch anhand der jeweiligen Fluoreszenzabklingdauer zu identifizieren.



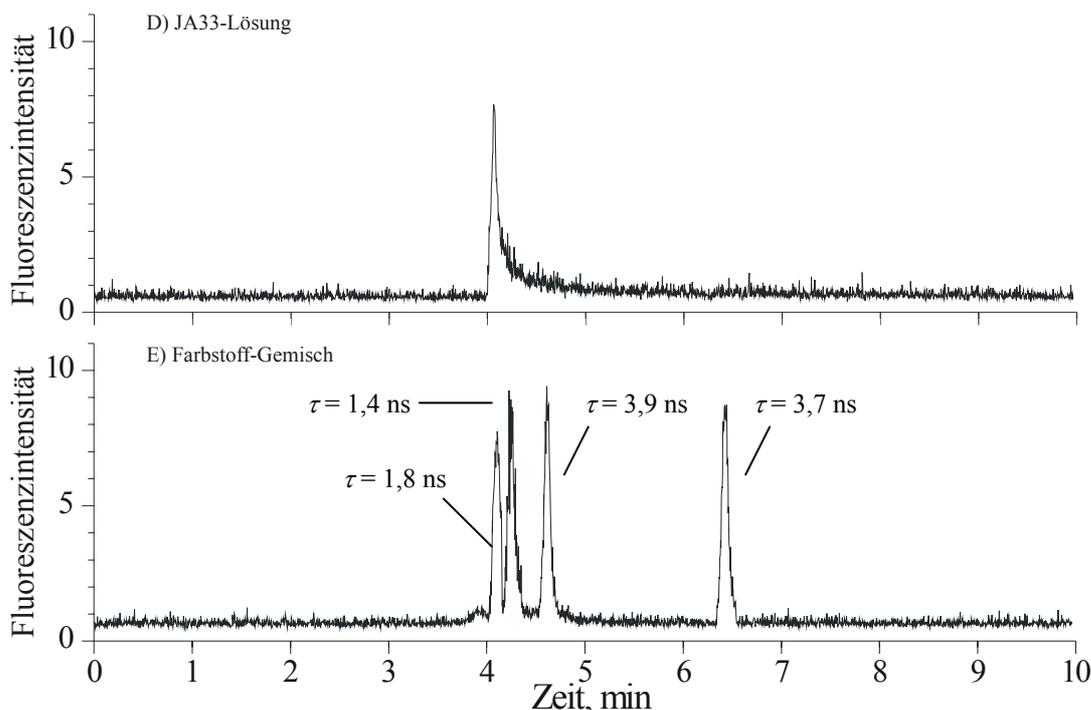


Abbildung 30: Elektropherogramme zur Trennung der Farbstoffe HIDCI, JA22E, JA33, JA34

Farbstoffe: HIDCI, JA22E, JA33, JA34; Konzentrationen: 10^{-10} M; Trennmedium: Ethylenglykol / wässrige Pufferlösung pH 6,0 (90 / 10 %); $I_D = 50 \mu\text{m}$; Kapillarlänge: 15,0 cm; effektive Kapillarlänge: 7,6 cm; Injektionsspannung: 10 kV, Injektionszeit: 15 s; Elektrophorese-spannung: 10 kV, resultierendes E-Feld: $666,67 \text{ V cm}^{-1}$. A) JA34-Lösung: $t_m = 6,39$ Minuten, $\mu = 2,98 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\tau = 3,7 \text{ ns}$; B) JA22E-Lösung: $t_m = 4,58$ Minuten, $\mu = 4,15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\tau = 3,9 \text{ ns}$; C) HIDCI-Lösung: $t_m = 4,21$ Minuten, $\mu = 4,52 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\tau = 1,4 \text{ ns}$; D) JA33-Lösung: $t_m = 4,05$ Minuten, $\mu = 4,69 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\tau = 1,8 \text{ ns}$; E) Farbstoffgemisch aus JA34-, JA22E-, HIDCI- und JA33-Lösungen zu gleichen Teilen: $\tau_{1. \text{Peak}} = 1,8 \text{ ns}$, $\tau_{2. \text{Peak}} = 1,4 \text{ ns}$, $\tau_{3. \text{Peak}} = 3,9 \text{ ns}$, $\tau_{4. \text{Peak}} = 3,7 \text{ ns}$. Farbstoff-Zuordnungen: 1. Peak: JA33; 2. Peak: HIDCI; 3. Peak: JA22E, 4. Peak: JA34.

Tabelle 6: Zuordnungen der Peaks

| Peak | Farbstoff | $\mu, \text{cm}^2 (\text{V s})^{-1}$ | τ, ns | $\tau(\text{Ensemble}), \text{ns}$ |
|------|-----------|--------------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1 | JA33 | $4,69 \times 10^{-5}$ | 1,8 | 1,8 |
| 2 | HIDCI | $4,52 \times 10^{-5}$ | 1,4 | 1,3 |
| 3 | JA22E | $4,15 \times 10^{-5}$ | 3,9 | 3,9 |
| 4 | JA34 | $2,98 \times 10^{-5}$ | 3,7 | 3,7 |

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, lassen sich mit den oben beschriebenen Methoden Proben untersuchen, die im Konzentrationsbereich von $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ liegen. Dabei hatte sich in den Elektropherogrammen die Fluoreszenz der Analyten deutlich vom Untergrund abgehoben und eine Identifikation war durch die Migrationszeit und Fluoreszenzabklingdauer möglich. In einem weiteren Experiment wurden Proben mit einer Konzentration im Bereich von $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ hergestellt. Bei den Elektropherogrammen dieser

Proben zeigten sich jedoch keine Peaks mehr, die auf die Anwesenheit von Analytmolekülen hindeuteten.

In der Absicht zu studieren, ob sich auch in Proben im Konzentrationsbereich von $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ Farbstoffmoleküle nachweisen lassen, wurde ein entsprechendes Farbstoffgemisch, bestehend aus JA22E und JA33 hergestellt. Wie bei den vorangegangenen beschrieben, wurde die Lösung mit den beiden Farbstoffen auf die Kapillare gegeben. Aber anstatt einfach die Intensität als Funktion der Zeit zu registrieren, wurde eine MCS-Spur von den eintreffenden Signalen aufgezeichnet. Im Prinzip stellt dies ebenfalls ein Elektropherogramm da, jedoch mit sehr hoher Zeitaufösung. Zwei Ausschnitte dieser Messung sind in Abbildung 31 dargestellt. Dabei handelt es sich jeweils um Zeitintervalle von 1,5 Sekunden, von denen das im oberen Bildabschnitt dargestellte nach etwa 4 Minuten aufgenommen wurde und das im unteren Bildabschnitt einen Zeitabschnitt nach etwa 4,75 Minuten darstellt. Wie der Abbildung 31 entnommen werden kann, treten in beiden Fällen Einzelmolekülereignisse deutlich aus dem Untergrund hervor.

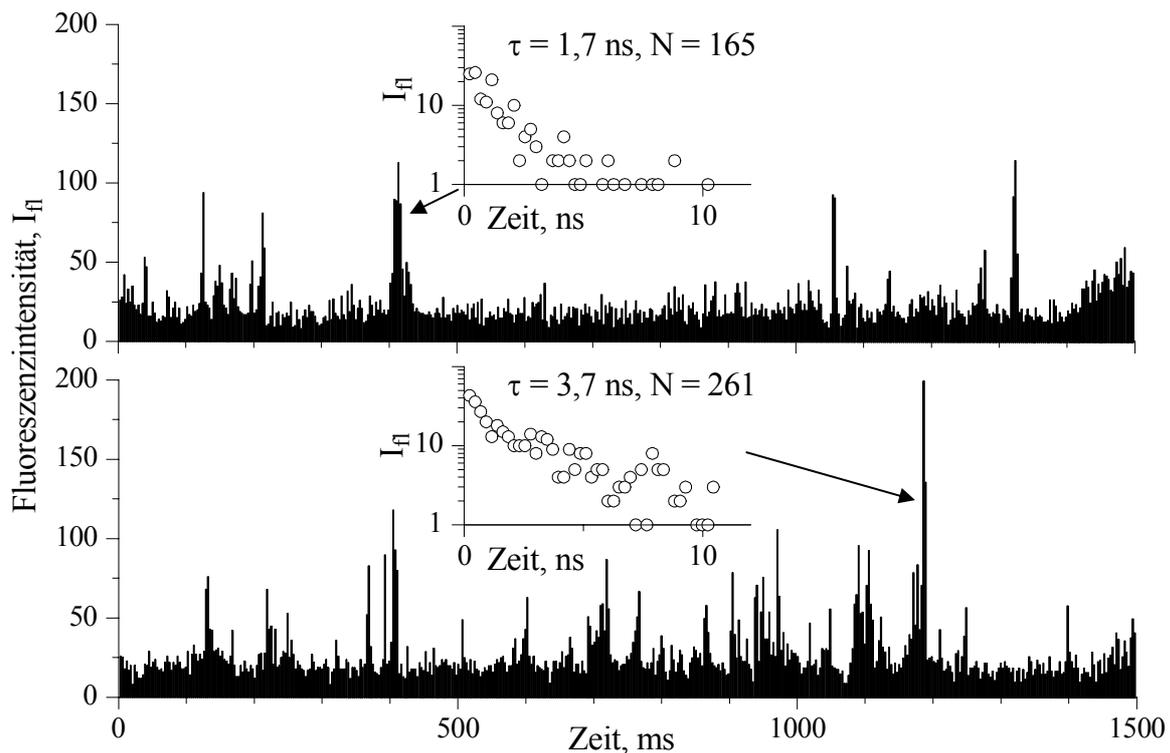


Abbildung 31: Einzelmolekül-Ereignisse und deren Fluoreszenzabklingdauern, während der Aufzeichnung des Elektropherogramms. Oben: MCS-Spur vom Farbstoff JA33; Unten: MCS-Spur vom Farbstoff JA22E, τ = Fluoreszenzabklingdauer, N = Anzahl der Einzelmolekül-Ereignisse.

Um die detektierten Moleküle zu identifizieren, wurde auch die auftretende Fluoreszenzabklingdauer der Ereignisse bestimmt. Wie ebenfalls der Abbildung zu entnehmen ist, stimmt die ermittelte Fluoreszenzabklingdauer ($\tau = 1,7 \text{ ns}$) nach einer Migrationsdauer von ca.

4 Minuten in etwa mit der Abklingdauer des Farbstoffs JA33 ($\tau = 1,8$ ns) überein. In gleicher Weise findet sich eine Übereinstimmung nach einer Migrationszeit von ca. 4,75 Minuten mit der Abklingdauer des Farbstoffs JA22E ($\tau = 3,9$ ns).

Anhand dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass eine elektrophoretische Trennung und Identifikation von unterschiedlichen Analyten auch auf Einzelmolekül-Niveau möglich ist.

3.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass zur Aufklärung von phänomenologischen Zusammenhängen von geladenen Molekülen im elektrischen Feld die Kapillarelektrophorese als Hilfsmittel herangezogen werden kann. So kann mit der Kapillarelektrophorese direkt die lineare Abhängigkeit zwischen angelegtem elektrischen Feld und Migrationsgeschwindigkeit bestimmt werden. Bei dieser Untersuchung konnte beobachtet werden, dass die Peakbreite mit den Migrationszeiten zunimmt. Diese Peak-Verbreiterung wird im Wesentlichen durch die Wechselwirkungen der Moleküle mit der Kapillarwand hervorgerufen.

Weiterhin konnte experimentell gezeigt werden, dass sich mittels Kapillarelektrophorese selbst Analyte einer Probe auf Einzelmolekül-Niveau trennen lassen. Die Gründe für diese hochempfindliche Detektion liegen zum einen an den eingesetzten optischen Komponenten wie Laser, einem Mikroskop-Objektiv mit großer numerischer Apertur und einer Avalanche Photodiode mit hoher Quantenausbeute. Zum anderen sind Kapillaren mit Innendurchmessern zwischen 50 – 200 μm gut geeignet, um darin auch geringe Mengen an Analytmolekülen nachzuweisen.

In den Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass Kapillaren mit einer effektiven Länge von 7 – 8 cm dazu geeignet sind, unterschiedliche Analyten effektiv zu trennen. Die ausgewählten Farbstoffe HIDCI, JA22E, JA33 und JA34 erwiesen sich bei dieser Studie als geeignet, um diese anhand ihrer unterschiedlichen Mobilität und Fluoreszenzabklingdauer eindeutig zu unterscheiden.

Insbesondere war es möglich mittels Kapillarelektrophorese eine Probe, die die Farbstoffe JA22E und JA33 als Analytmoleküle enthielt, aufzutrennen, so dass selbst separierte individuelle JA22E- und JA33-Moleküle anhand ihrer Migrationszeiten und Fluoreszenzabklingdauern, identifiziert werden konnten.

4 Anwendungen fluoreszenzbasierter Methoden in der Tribologie

4.1 Probleme in der Tribologie

Die Bezeichnung „Tribologie“ wird seit 1966 in der Wissenschaft verwendet und ist nach DIN 50320 [58] definiert als die Wissenschaft von aufeinander einwirkenden Oberflächen in Relativbewegung. Es gibt eine Vielzahl von technischen Geräten und Maschinen, in denen bewegte Teile miteinander wechselwirken. Um eine störungsfreie Funktion solcher Systeme zu gewährleisten, wird Schmiermittel zwischen die bewegten Teile gegeben. Das Schmiermittel dient dazu, den Verschleiß zu minimieren, und solange sich genug Schmiermittel zwischen den Teilen befindet, kommt es mechanisch kaum zu Problemen. Schwierigkeiten treten erst auf, wenn zu wenig Schmiermittel vorhanden ist.

Ein großes Problem bei Schmiersystemen und in noch größerem Maße in der Hydraulik ist das Auftreten von Leckagen und Haarrissen. In der Regel handelt es sich in beiden Anwendungsbereichen um Systeme mit geschlossenen Kreisläufen, in denen z. B. ein Ölverlust den Stillstand oder Ausfall des Systems bedeuten kann. In diesen Bereichen ist oft hoher Zeit- und Personalaufwand notwendig, um Haarrisse oder Leckagen im System aufzufinden und gegebenenfalls zu beseitigen. Eine Möglichkeit Leckagen aufzuspüren ist derzeit die Ultraschalluntersuchung. Als Alternative zur Ultraschalluntersuchung bietet sich der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen an. Durch die Zugabe eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes zum Schmiermittel oder zum Hydrauliköl kann dann, im Fall einer auftretenden Undichtigkeit, mit einer geeigneten Lichtquelle der Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt und mit bloßem Auge erkannt werden. Hierdurch wird der Zeit- und Personalaufwand minimiert und Wartungskosten können gesenkt werden.

Für den Einsatz im Schmierstoff- und Hydraulikbereich werden spezielle Anforderungen an einen zweckmäßigen Fluoreszenzfarbstoff gestellt. Solche Farbstoffe sollten besondere physikalisch-chemische Eigenschaften wie eine hohe Photostabilität oder Fluoreszenzquantenausbeute besitzen. Aufgrund der verschiedenen Einsatzbereiche im Tribologie-Sektor sollten die Fluoreszenzfarbstoffe zudem eine hohe thermische Stabilität besitzen. Ein weiterer wichtiger Parameter besteht darin, dass Fluoreszenzfarbstoff-Additive die Eigenschaften der Öle, wie Fließverhalten oder Siedepunkt, nicht verändern dürfen. Damit der Fluoreszenzfarbstoff nicht auskristallisiert, sollte dieser in hohem Maße im betreffenden Öl löslich sein.

Aus praktischen und wirtschaftlichen Gründen sind besonders Fluoreszenzfarbstoffkonzentrate erwünscht, da sie das Einfärben der Öle vereinfachen. So kann z. B. der Ölverlust in einem Hydraulik-System bei Wartung der Maschine durch ein Farbstoffkonzentrat-Öl-

Gemisch ergänzt werden. Durch Inbetriebnahme der Maschine verteilt sich dieses innerhalb kurzer Zeit im kompletten System.

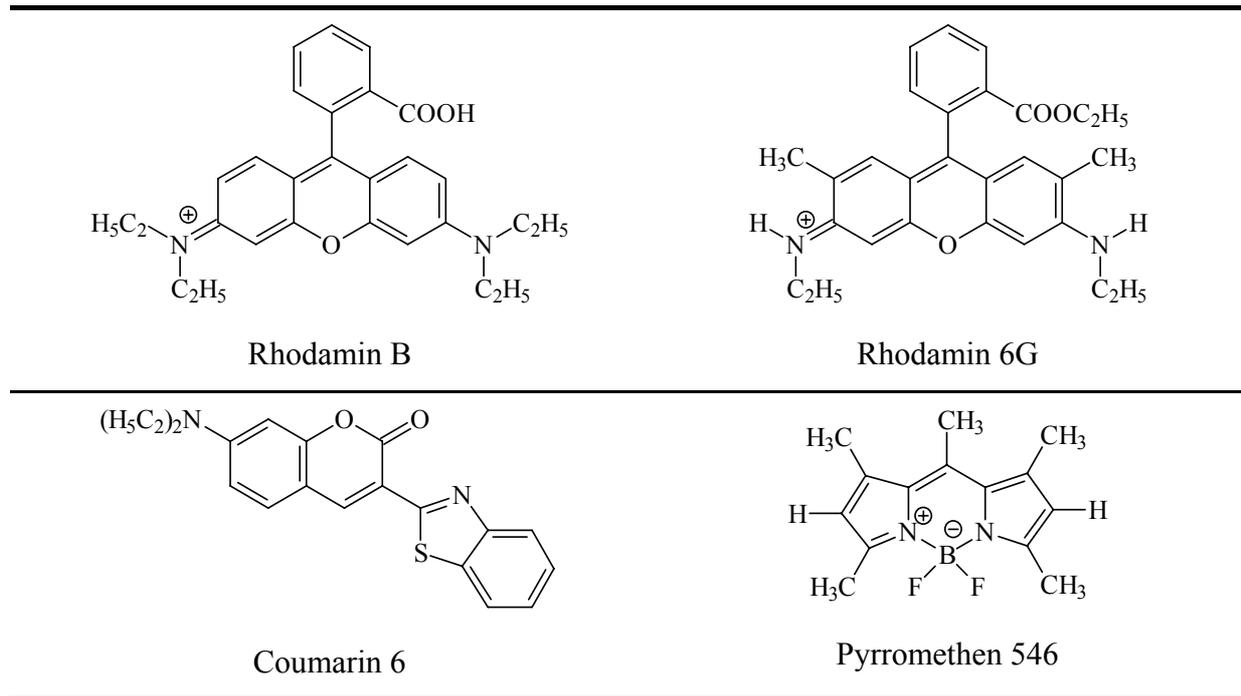
In der Praxis hat sich gezeigt, dass die Zugabe von etwa 0,1 – 0,3 g Farbstoff pro Liter Öl zu einer ausreichend hohen Fluoreszenz führt, um diese visuell gut wahrnehmen zu können. Verwendet man dabei ein Konzentrat, welches z. B. die 1000-fache Menge an Farbstoff enthält, als das eigentlich eingefärbte Öl enthalten müsste, so ist lediglich die Zugabe von geringsten Mengen an Farbstoffkonzentrat erforderlich. Die Zugabe von wenigen Promille des eigentlichen Schmierstoff- oder Hydrauliköl-Volumens ist bei der Wartung von Maschinen und Systemen in der Regel ohne weiteres möglich [59]. Hingegen besteht bei weniger hoch konzentrierten Fluoreszenzfarbstoffkonzentraten die Notwendigkeit, größere Mengen des Schmiermittels oder Hydrauliköls auszutauschen, was oft einen hohen Zeit- und Kostenaufwand bedeutet.

Die zuvor beschriebenen Darstellungen der Problematiken in der Tribologie wurden zum Anlass genommen, öllösliche Fluoreszenzfarbstoffe zu entwickeln. Ein weiteres Ziel war dann, Konzentrate auf Basis der öllöslichen Fluoreszenzfarbstoffe herzustellen.

4.2 Strategie zur Entwicklung öllöslicher Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe werden aufgrund ihrer chemischen Struktur in verschiedene Klassen eingeteilt [60]. Zu diesen Klassen zählen unter anderem Xanthen-Farbstoffe, Coumarine oder Pyrromethene, siehe Tabelle 7. Zu den bekanntesten Fluoreszenzfarbstoffen zählen dabei Rhodamin-Derivate, wie z. B. Rhodamin B und Rhodamin 6G. Diese Farbstoffe sowie die Farbstoffe Coumarin 6 und Pyrromethen 546 zeichnen sich durch hohe Fluoreszenzquantenausbeuten, die in der Nähe von eins liegen, und eine hohe Photostabilität aus [61, 62].

Tabelle 7: Chemische Strukturen von Rhodamin B und Rhodamin 6G, Coumarin 6, Pyrromethen 546



Die Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen ist stark davon abhängig, in welchem Anwendungsbereich sie eingesetzt werden sollen. So spielt das umgebende Milieu eine besondere Rolle. Zur Untersuchung von Fluoreszenzerscheinungen sollten die Farbstoffe gelöst vorliegen. Im Allgemeinen sind die Rhodamine, Coumarine und die Pyrromethene in Alkoholen, wie z. B. Ethanol oder Methanol sehr gut löslich. In Wasser sind Rhodamine hingegen nur bedingt und Coumarine sogar nur schwer löslich. Dagegen sind Pyrromethene in Wasser nahezu unlöslich. Wird als Lösungsmittel für die Farbstoffe hingegen Öl verwendet, so zeigt sich, dass die Rhodamine schlecht löslich, Coumarine und Pyrromethene hingegen gut löslich sind.

Ausgehend von dem oben beschriebenen Verhalten wurden speziell Pyrromethene als Grundlage zur Entwicklung von neuen öllöslichen Fluoreszenzfarbstoffkonzentraten näher untersucht.

4.2.1 Löslichkeit von Pyrromethen-Farbstoffen in verschiedenen Lösungsmitteln und Mineralölen

Mit dem Begriff Löslichkeit wird die maximale Menge eines Stoffes, die ein Lösungsmittel bei einer bestimmten Temperatur aufnehmen kann, bezeichnet. Die Löslichkeit entspricht dabei der Höchst- oder Sättigungskonzentration [63].

Da es ein Ziel dieser Arbeit ist, neue öllösliche Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoffkonzentrate zu entwickeln, soll hier zunächst einmal der Begriff Mineralöl näher betrachtet werden. Unter Mineralöl ist eine Sammelbezeichnung für die flüssigen Destillationsprodukte aus mineralischen Rohstoffen wie Erdöl, Braun- und Steinkohlen, Holz und Torf zu verstehen. Daher bestehen Mineralöle im Wesentlichen aus Gemischen von gesättigten Kohlenwasserstoffen.

Um definierte Bedingungen zu schaffen, wurden Löslichkeitsversuche zunächst in Rapsmethylester (SPEC: LOG-V/WH; TK 008/01) der Firma Klüber Lubrication durchgeführt. Für die Löslichkeitsstudie von Pyrromethen-Farbstoffen im Rapsmethylester wurde zunächst der kommerziell erhältliche Farbstoff Pyrromethen 567 eingesetzt (Struktur des Farbstoffs siehe Abbildung 32).

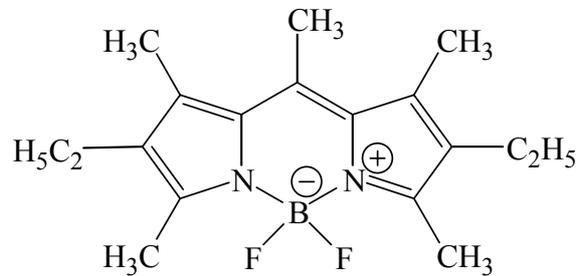


Abbildung 32: Chemische Struktur von Pyrromethen 567

Zum einen soll gezeigt werden, dass die Pyrromethen-Farbstoffe eine hohe Öllöslichkeit aufweisen, zum anderen soll ein Pyrromethen-Farbstoffkonzentrat entwickelt werden. Hierzu erscheint zunächst ein Lösungsmittel-Screening sinnvoll, bei dem untersucht wird, welches Lösungsmittel zur Darstellung eines Farbstoffkonzentrats auf Pyrromethen-Basis geeignet ist.

In der Absicht die Löslichkeit von Pyrromethen 567 in unterschiedlichen Lösungsmitteln zu bestimmen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Bei Raumtemperatur wurden zu einem Milliliter Lösungsmittel ein Milligramm Farbstoff gegeben und durch Rühren aufgelöst. Nachdem sich der Farbstoff aufgelöst hatte, wurde ein weiteres Milligramm des Farbstoffs zur Lösung gegeben und gerührt. Dies wurde solange wiederholt, bis sich ein Bodensatz vom Farbstoff bildete, der sich auch durch längeres Rühren nicht auflöste. Durch Temperaturerhöhung mit einem Wasserbad auf etwa 60 °C, konnte die Löslichkeit erhöht werden, so dass sich der gesamte Farbstoff in Lösung befand. Bildete sich nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur erneut ein Farbstoffbodensatz, so war die maximal gelöste Menge an Farbstoff überschritten. Im Anschluss daran wurde solange tropfenweise Lösungsmittel zugegeben, bis der ausgefallene Farbstoff wieder in Lösung übergang.

Wie im Abschnitt 4.2.2 beschrieben wird, sollte das Lösungsmittel nach dem Verzeichnis brennbarer Flüssigkeiten (VbF) zu der Klasse A III gehören. Daher ist die exakte Löslichkeit des Farbstoffes nur bei einigen Lösungsmitteln wichtig. Um beim Screening zunächst einen groben Überblick über die Löslichkeit zu erhalten, wurde eine willkürliche Klassifizierung der Lösungsmittel vorgenommen. Diese Klassifizierung erfolgte wie folgt: **Klasse IV:** > 15 mg Pyrromethen 567 in 1 mL Lösungsmittel; **Klasse III:** 10 – 15 mg Pyrromethen 567 in 1 mL Lösungsmittel; **Klasse II:** < 10 mg Pyrromethen 567; **Klasse I:** keine Löslichkeit im Lösungsmittel. Die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchung sind in den Tabelle 8 zusammengefasst, dabei ist mit T_{Fl} die Flammtemperatur des Lösungsmittels bezeichnet.

Tabelle 8 Lösungsmittel der Löslichkeitsklassen; Klasse I: keine Löslichkeit im Lösungsmittel, Klasse II: Löslichkeit < 10 mg Pyrromethen 567 pro 1 mL Lösungsmittel, Klasse III: 10 – 15 mg Pyrromethen 567 in 1 mL Lösungsmittel, Klasse IV: Löslichkeit > 15 mg Pyrromethen 567 pro 1 mL Lösungsmittel; ein Haken in Spalte VbF AIII bedeutet, dass dies Lösungsmittel den Anforderungen gemäß dem Verzeichnis brennbarer Flüssigkeiten AIII entspricht.

| Lösungsmittel | Klasse | T _{Fl} , °C | VbF AIII |
|-----------------------|--------|----------------------|----------|
| Wasser | I | --- | --- |
| 1,4-Dioxan | II | 11 | |
| 1-Oktanol | II | 82 | ✓ |
| Butylacetat | II | 22 | |
| Diesel | II | > 55 | ✓ |
| Ethylenglykol | II | 111 | |
| Mineralöl | II | > 150 | |
| Petroleum | II | 60 | ✓ |
| Rapsmethylester | II | > 170 | |
| Cyclohexan | III | - 18 | |
| Dichlormethan | III | --- | --- |
| Diethylether | III | - 40 | |
| Ethanol | III | 17 | |
| Methanol | III | 16 | |
| n-Hexan | III | - 22 | |
| n-Pentan | III | - 50 | |
| Oktansäure | III | 132 | |
| Oktansäurechlorid | III | 82 | ✓ |
| Tetrachlorkohlenstoff | III | --- | --- |
| Acetophenon | IV | 82 | ✓ |
| Ethylbenzoat | IV | 91 | ✓ |
| Nitrobenzol | IV | 88 | ✓ |
| Tetrahydrofuran | IV | - 22 | |
| Tetralin | IV | 77 | --- |
| Toluol | IV | 4 | --- |
| Xylol | IV | 25 | |

In Tabelle 8 sind zum Teil Lösungsmittel eingetragen, welche in hohem Maße mit Mineralölen mischbar sind. Die hier aufgeführten Lösungsmittel eignen sich aufgrund der geringen Pyrromethen-Löslichkeit nicht, um Farbstoffkonzentrate herzustellen. Bei zwei

Lösungsmitteln der Klasse III wurde die Löslichkeit von Pyrromethen 567 genauer bestimmt. In einem Milliliter Mineralöl konnten maximal 3,3 mg Pyrromethen 567 und in einem Milliliter Rapsmethylester konnten maximal 4,2 mg Pyrromethen 567 gelöst werden.

Da in die Klasse IV (Tabelle 8) die Lösungsmittel fallen, in denen Pyrromethen 567 die höchste Löslichkeit aufweist, wurde hierin die Löslichkeit genauer bestimmt. Hierbei ergab sich für einen Milliliter Lösungsmittel Tetrahydrofuran, Tetralin, Toluol oder Xylol eine Löslichkeit von 16 mg. In Milliliter der Lösungsmittel Ethylbenzoat und Nitrobenzol konnten 150 mg Pyrromethen gelöst werden. 180 mg Pyrromethen 567 ließen sich in einem Milliliter Acetophenon lösen. Aufgrund dieser Ergebnisse zeigte sich, dass es grundsätzlich möglich ist, Farbstoffkonzentrate auf Pyrromethen 567-Basis herzustellen.

4.2.2 Farbstoffkonzentrate

Aufgrund der beschriebenen Problemstellung wurde für den Einsatzbereich der Tribologie und Hydraulik ein Fluoreszenzfarbstoffkonzentrat mit folgenden Eigenschaften gesucht. Zur optimalen Erkennung sollte die Fluoreszenz im gelben oder grünen Spektralbereich liegen und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen. Aus praktischen und wirtschaftlichen Gründen sollte die Anregung der Fluoreszenz im ultravioletten Spektralbereich bei etwa 360 nm erfolgen [64]. Hierdurch lassen sich preiswerte Schwarzlichtlampen verwenden, deren Licht nicht weiter stört, da das menschliche Auge in diesem Wellenlängenbereich unempfindlich ist (vgl. Abbildung 3). In vielen Fällen ist die Fluoreszenz stark abhängig vom umgebenden Lösungsmittel. Aus diesem Grund sollten die Farbstoffe insbesondere in Ölen ein gutes Fluoreszenzverhalten zeigen. Damit der Fluoreszenzfarbstoff nicht auskristallisiert und zu Problemen in den Schmier- oder Hydrauliksystemen führt, ist neben den optischen Eigenschaften des Farbstoffes eine gute Öllöslichkeit gefordert. Ferner sollte aus ökologischen Gründen der Fluoreszenzfarbstoff nicht wasserlöslich sein.

In vielen industriellen Bereichen sind zudem sicherheitstechnische Anforderungen zu berücksichtigen. Aus diesem Umfeld heraus ergibt sich, dass der Flammpunkt T_{FI} eines neuen Fluoreszenzfarbstoffkonzentrates im Bereich des Flammpunktes der Mineralöle (55 °C – 100 °C) oder darüber liegt. In der Praxis hat sich gezeigt, dass einige organische Lösungsmittel (z. B. Acetophenon, $T_{FI} = 82$ °C; Nitrobenzol, $T_{FI} = 91$ °C) gut verwendbar sind. Ausschlaggebend jedoch für eine Verwendbarkeit in der Industrie ist das Verzeichnis für brennbare Flüssigkeiten VbF (siehe Anhang). Aus diesem Verzeichnis muss das neue Fluoreszenzfarbstoffkonzentrat mindestens den Anforderungen der Klasse A III entsprechen. Aus den schon erwähnten praktischen Erwägungen sollte das Fluoreszenzfarbstoffkonzentrat die 100- bis 1000fache Menge an Farbstoff enthalten, als das eingefärbte Mineralöl enthalten

muss. Dies bedeutet, dass sowohl der Farbstoff, als auch das Konzentrat eine gute Mischbarkeit mit Ölen aufweisen sollte.

Aufgrund der Spezifizierung des Lösungsmittels, welches der Klasse VbF A III angehören sollte, können einige der in der Tabelle 8 aufgeführten Lösungsmittel nicht verwendet werden, hierzu zählen auch die Lösungsmittel Tetrahydrofuran, Tetralin sowie Toluol. Bei Acetophenon und Ethylbenzoat kristallisiert der Farbstoff mit einer Konzentration von 150 mg pro Milliliter Lösungsmittel bei einer Lagertemperatur unterhalb von 10 °C aus, so dass auch diese Lösungsmittel nicht für Farbstoffkonzentrate geeignet erscheinen. Aufgrund des hohen Gefahrenpotentials, das von Nitrobenzol (giftig, umweltschädlich) ausgeht, kommt dieses Lösungsmittel ebenfalls nicht in Betracht. Aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Strukturen der bisher bekannten Pyrromethen-Farbstoffe [61, 62, 65, 66] ist eine Übertragung der Löslichkeitsuntersuchungen von Pyrromethen 567 auf andere Pyrromethene ohne weiteres möglich.

In früheren Arbeiten [61, 62, 65, 66, 67] sind im Wesentlichen an den Pyrromethen-Grundgerüsten bereits aliphatische Alkylketten bis zu $-C_3H_7$ synthetisiert worden. Die Löslichkeiten dieser Pyrromethene liegen zwischen 5 – 10 mg pro mL Rapsmethylester, was bedeutet, dass durch diese Modifikationen keine wesentliche Erhöhung der Löslichkeit erzielt worden ist. Dennoch bietet sich die Farbstoffklasse der Pyrromethene an, um durch chemische Modifikation der Seitenketten neue Farbstoffe zu synthetisieren, deren Löslichkeit in Ölen deutlich höher ist.

4.2.3 Synthese von Pyrromethen

Die ersten Synthesen von Pyrromethenfarbstoffen haben M. Shah und J.H. Boyer 1990 beschrieben [67], Abbildung 33.

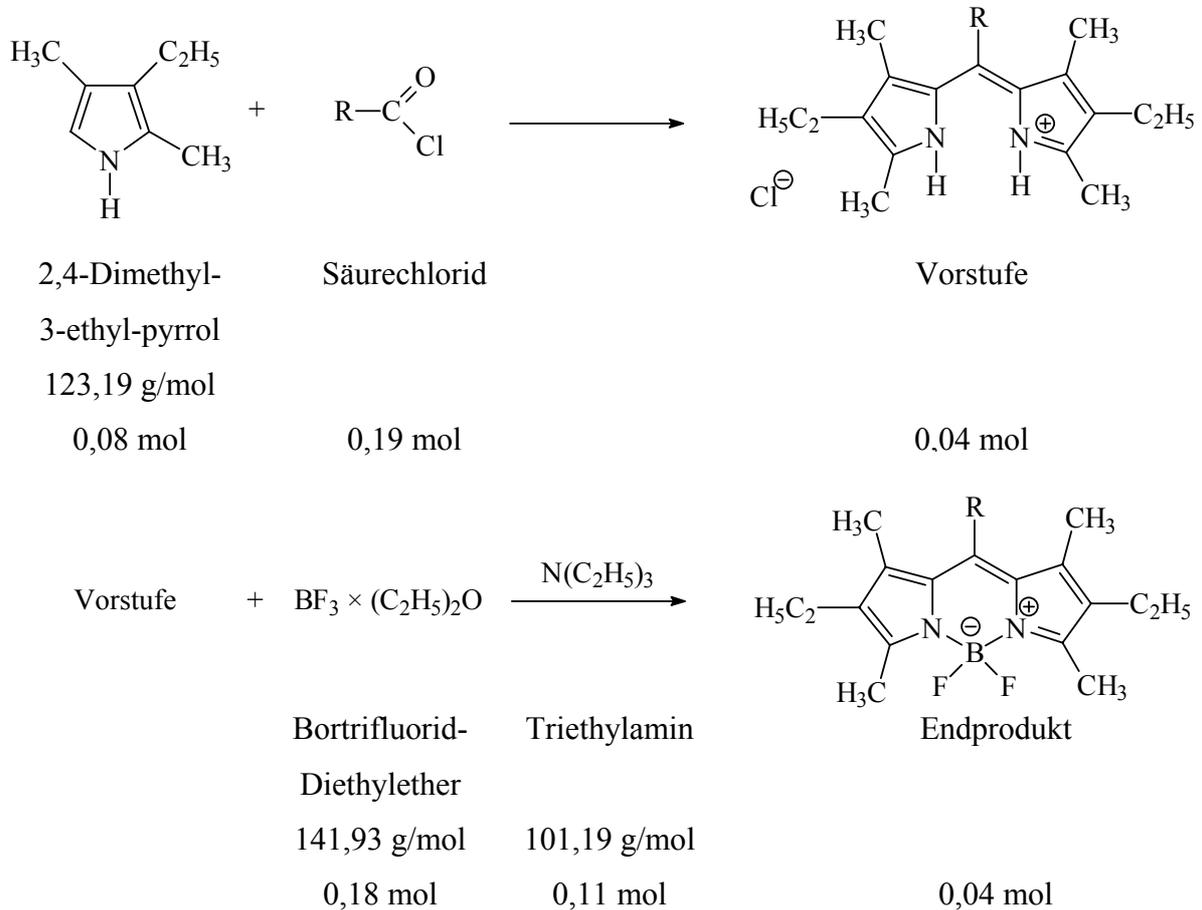


Abbildung 33: Darstellung von Pyrromethen nach M. Shah und J.H. Boyer

Die Darstellung der Pyrromethen-Farbstoffe erfolgt zunächst über ein offenes Vorprodukt durch eine Acylierung eines Pyrrolderivates mit einem Säurechlorid unter Freisetzung von Chlorwasserstoff. In einer anschließenden Kondensation mit einem weiteren Pyrrolderivat wird ein Hydroxid-Ion gebildet. Zur Charakterisierung des Vorproduktes kann dieses aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. Die weitere Umsetzung findet in Gegenwart von Triethylamin als Katalysator statt. Der Aufbau des chromophoren Systems erfolgt mit Bortrifluorid-Diethylether-Komplex. Dabei werden die Stickstoffatome der Pyrrole mit einem Bordifluorid-Ion überbrückt.

4.2.3.1 Synthesevorschrift von Pyrromethen 567

Eine Zielsetzung der von Shah und Boyer beschriebenen Synthese war es, neben dem Produkt auch die Vorstufe zu isolieren. Anhand der Synthese von Pyrromethen 567 wird die Vorgehensweise von Shah und Boyer aufgezeigt.

In eine Lösung von 10,0 g (0,08 mol) 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol in 85 mL Dichlormethan wurde unter Rühren innerhalb von 30 Minuten tropfenweise 14,7 g (0,187 mol) Acetylchlorid zugeführt. Zur vollständigen Umsetzung wurde unter Rückfluss bei 40 °C das Reaktionsgemisch erhitzt. Anschließend konnte auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 800 mL Pentan versetzt werden. Zum Ausfällen des Hydrochlorids musste die Mischung für 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt werden. Mit einer nachfolgenden Filtration konnte das Hydrochlorid des Vorproduktes erhalten werden.

Für die Synthese zum Pyrromethen 567 wurden 7,4 g (24 mmol) des Vorproduktes in 600 mL Toluol suspendiert und unter stetigem manuellem Rühren mit 15 mL (113 mmol) Triethylamin als Katalysator versetzt. Zur Ausbildung des chromophoren Systems wurde unter weiterem Rühren tropfenweise 25 mL (204 mmol) Bortrifluorid-Diethylether-Komplex zugegeben. Mit Hilfe von „Schwarzlicht“ (Wellenlänge ca. 366 nm) ließ sich bei diesem Reaktionsschritt die Umsetzung zum Farbstoff anhand einer grünen Fluoreszenz beobachten. Das Gemisch wurde unter Rühren für 30 Minuten auf 80 °C erhitzt und danach auf 40 °C abgekühlt. Durch mehrmaliges Ausschütteln der Reaktionsmischung mit jeweils 100 mL 40 °C warmen Wasser wurde eine Vorreinigung des Produktes erzielt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und die wässrige Phase konnte verworfen werden. Nach Abfiltrieren des Magnesiumsulfates und Einrotieren des Lösungsmittelgemisches am Rotationsverdampfer entstand als Produkt ein dunkelbrauner Rückstand, der sich durch Säulenchromatographie (vgl. Kapitel 4.2.3.4 Reinigung der Produkte) reinigen ließ.

4.2.3.2 Modifizierte Pyrromethen-Synthese

Die Einführung unterschiedlich langer Alkylketten an das Pyrromethen-Gerüst lässt sich durch Verwendung anderer Säurechloride bei der Synthese erreichen. Die eingesetzten Säurechloride sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Reaktion fand zunächst ausschließlich mit 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol statt. In einem weiteren Schritt (vgl. Kapitel 4.2.3.3 Allgemeine Einstufen-Synthese der modifizierten Pyrromethene) erfolgte dann eine Optimierung der Synthese.

Einer Lösung von 10,0 g (0,08 mol) 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol in 85 mL Dichlormethan wurden unter Rühren innerhalb von 30 Minuten tropfenweise 0,187 mol des entsprechenden Säurechlorids (vgl. Tabelle 9) zugeführt. Zur vollständigen Umsetzung musste die Reaktionsmischung für zwei Stunden unter Rühren auf 40 °C (Rückfluss) erhitzt werden. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 800 mL n-Pentan versetzt. Um das Hydrochlorid zu erhalten, wurde die Mischung für 15 Stunden gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und das Vorprodukt im überschüssigen Säurechlorid eingeeengt.

Tabelle 9: Eingesetzte Säurechloride; Sdp.: Siedepunkt, M: Molmasse, n: Stoffmenge, m: Masse

| Säurechlorid | Summenformel | M, g mol ⁻¹ | n, mol | m, g | Sdp., °C |
|--------------------|------------------------------------|------------------------|--------|------|----------|
| Acetylchlorid | C ₂ H ₃ ClO | 78,50 | 0,187 | 14,7 | 52 |
| Pentansäurechlorid | C ₅ H ₉ ClO | 120,49 | 0,187 | 22,5 | 126 |
| Hexansäurechlorid | C ₆ H ₁₁ ClO | 134,50 | 0,187 | 25,2 | 152 |
| Heptansäurechlorid | C ₇ H ₁₃ ClO | 148,51 | 0,187 | 27,7 | 173 |
| Oktansäurechlorid | C ₈ H ₁₅ ClO | 162,52 | 0,187 | 30,4 | 195 |

Die Umsetzung zum Farbstoff erfolgte durch Suspendieren der jeweiligen Vorstufe mit entsprechenden, überschüssigen Säurechlorid in 600 mL Toluol. Unter Rühren bei Raumtemperatur wurden 15 mL (113 mmol) Triethylamin und anschließend tropfenweise 25 mL (204 mmol) Bortrifluorid-Diethylether-Komplex zugegeben. Das Gemisch wurde unter Rühren für 30 Minuten auf 80 °C erhitzt und danach auf 40 °C abgekühlt. Zur Entfernung von Verunreinigungen folgte ein Ausschütteln mit jeweils 100 mL 40 °C warmen Wasser. Die Verunreinigungen befanden sich danach in der wässrigen Phase und wurden verworfen, die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren des Magnesiumsulfates und Absaugen des Lösungsmittelgemisches am Rotationsverdampfer wurde das Produkt erhalten. Bei allen Synthesen entstand ein dunkler, öliges Rückstand. Der Rückstand bestand aus dem Rohprodukt und dem eingesetzten Säurechlorid bzw. der entsprechenden Säure. Die Säurechloride zersetzen sich unter Wassereinfluss zur entsprechenden Säure.

4.2.3.3 Allgemeine Einstufen-Synthese der modifizierten Pyrromethene

Die zuvor beschriebenen Synthesewege dienten dazu, neben den Endprodukten auch die Vorstufen zu isolieren, was für eine Charakterisierung unabdingbar war. Wurde das Zwischenprodukt nicht benötigt, konnten mit dem folgenden Syntheseweg Arbeitsaufwand und Chemikalienverbrauch minimiert werden. Der modifizierte Darstellungsweg ermöglichte

zudem die Herstellung der Farbstoffe in einem einzigen Reaktionsgefäß. Durch diese Optimierung wurde es möglich, die Synthese direkt im Rotationsverdampfer durchzuführen.

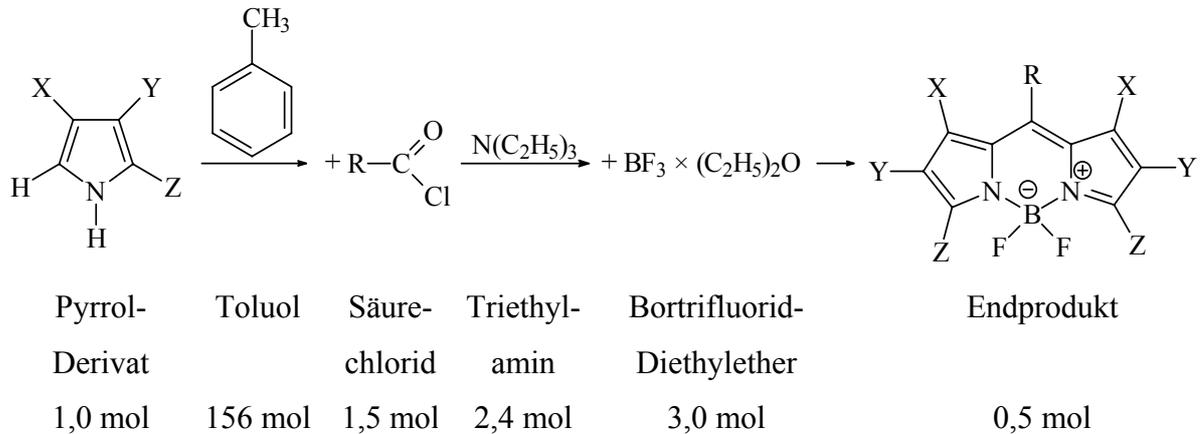


Abbildung 34: Darstellung von Pyrromethen

In eine Lösung von 1,0 mol Pyrrol-Derivat in 156 mol Toluol wurde unter Rühren innerhalb von 30 Minuten tropfenweise 1,5 mol Säurechlorid zugeführt. Erhitzen der Reaktionsmischung unter Rühren bei 40 °C für zwei Stunden führte zu einer nahezu vollständigen Umsetzung. Unter weiterem Rühren wurde langsam 2,4 mol Triethylamin gegeben. Das Gemisch wurde für weitere 30 Minuten gerührt und anschließend tropfenweise mit 3,0 mol Bortrifluorid-Diethylether-Komplex versetzt. Die Entstehung des Fluoreszenzfarbstoffes konnte mit Hilfe einer Schwarzlichtlampe durch eine auftretende Fluoreszenz beobachtet werden. Das Gemisch wurde unter Rühren für 30 Minuten auf 80 °C erhitzt. Zur Entfernung von Verunreinigung aus dem Reaktionsgemisch wurde danach auf 40 °C abgekühlt und mehrmals mit warmen Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde von der organischen Phase getrennt. Da die Siedepunkte der überschüssigen Säurechloride zum Teil relativ hoch liegen, wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck (etwa 400 mbar) abdestilliert. Bei den Farbstoffen Pyrromethen 567, Butylpyrromethen 567 und Pentylpyrromethen 567 bildeten sich auf diese Weise Kristalle. Hingegen blieb bei den Farbstoffen Hexylpyrromethen 567 und Heptylpyrromethen 567 ein dunkler, öliges Rückstand zurück. Die Reinigung der Farbstoffe wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

4.2.3.4 Reinigung der Produkte

Die Reinigung der Rohprodukte für die Farbstoffe Pyrromethen 567, Butyl- und Pentylpyrromethen 567 erfolgte mittels Säulenchromatographie. Als stationäre Phase fand Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 0,063 – 0,200 mm Einsatz. Für die mobile Phase wurde

Chloroform eingesetzt. In der gelb-grünlichen Fraktion befand sich das gewünschte, gereinigte Produkt. Alle weiteren Fraktionen der Chromatographie enthielten neben Farbstoff auch Verunreinigungen. Diese Fraktionen wurden vereint und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach dem Abdestillieren des Chloroforms am Rotationsverdampfer konnte das Produkt erhalten werden. Durch Umkristallisation mit Ethylacetat ließ sich der Farbstoff weiter reinigen und als Endprodukt entstanden orange Kristalle.

Die Produkte Hexyl- und Heptylpyrromethen 567 ließen sich auf diese Weise nicht reinigen, da die überschüssigen Reaktanden, Heptansäurechlorid bzw. Oktansäurechlorid, sich durch Destillation unter Normaldruck nicht entfernen ließen. Nach einer Destillation unter Vakuum hingegen blieb eine ölige Masse zurück. Nach mehrtägigem Stehen bei Raumtemperatur schieden sich aus dieser Masse Farbstoffkristalle ab. Durch Vakuumfiltration konnten die Kristalle schließlich von der öligen Masse abgetrennt werden. Mit der oben beschriebenen Säulenchromatographie sowie anschließender Umkristallisation in Ethylacetat wurden die Farbstoffe gereinigt.

Die Reinigung der Farbstoffe Pyrromethen 546 und Dipyrromethen 546, siehe folgenden Abschnitt, erfolgte durch Säulenchromatographie und anschließender Umkristallisation mit Ethylacetat. Der Farbstoff Heptylpyrromethen 546 konnte durch Auskristallisieren aus dem öligen Rückstand und anschließender Säulenchromatographie gereinigt werden. Die Farbstoffe Pyrrolpyrromethen und Indolpyrromethen konnten aufgrund ihrer Instabilität von wenigen Minuten nicht isoliert und gereinigt werden.

4.2.4 Synthese neuer Pyrromethen-Farbstoffe

Für die Darstellungen von Pyrromethenen werden unterschiedliche Pyrrolderivate eingesetzt, diese müssen lediglich für die Acylierung in Position 5 einen Wasserstoff tragen, siehe Abbildung 35. So breit die Palette der verschiedenen Pyrrolderivate ist, so vielfältig ist auch die Anzahl der einsetzbaren Säurechloride.

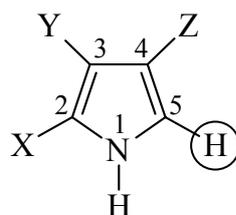


Abbildung 35: Pyrrol-Struktur

4.2.4.1 Variationen der Edukte

Um die Bandbreite der Möglichkeiten aufzuzeigen, wurden Pyrrolderivate mit verschiedenen Säurechloriden umgesetzt. Im Wesentlichen wurden die Pyrrole 2,4-Dimethylpyrrol, Pyrrol, Indol und die Säurechloride Acetylchlorid, Adipinsäuredichlorid und Oktansäurechlorid eingesetzt.

Wurde 2,4-Dimethylpyrrol mit Acetylchlorid umgesetzt, so entstand der kommerziell erhältliche Farbstoff Pyrromethen 546, Abbildung 36:

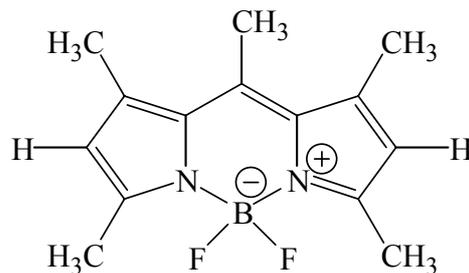


Abbildung 36: Pyrromethen 546

Bei der Umsetzung von 2,4-Dimethylpyrrol mit Oktansäurechlorid entstand der Farbstoff Heptylpyrromethen 546:

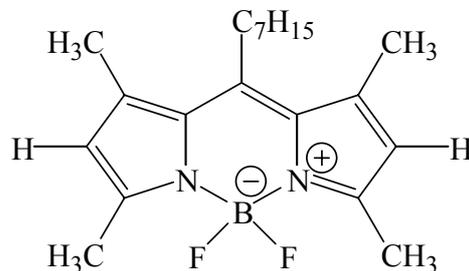


Abbildung 37: Heptylpyrromethen 546

Die Pyrrolderivate können auch mit Disäuredichloride zur Reaktion gebracht werden. Wurde 2,4-Dimethylpyrrol mit Adipinsäuredichlorid umgesetzt, so entstand „Dipyrromethen 546“ (vgl. Abbildung 38). Bei den bisherigen Synthesen der Pyrromethen-Farbstoffe betrug das Verhältnis vom Pyrrol zum Säurechlorid etwa 2:1. Für die Reaktion eines Pyrrols mit einem Disäuredichlorid ist die vierfache Menge an Pyrrol im Vergleich zum Disäuredichlorid notwendig. Für die nahezu vollständige Reaktion sollte in jedem Fall ein Überschuss an Säurechlorid bzw. Disäurechlorid eingesetzt werden.

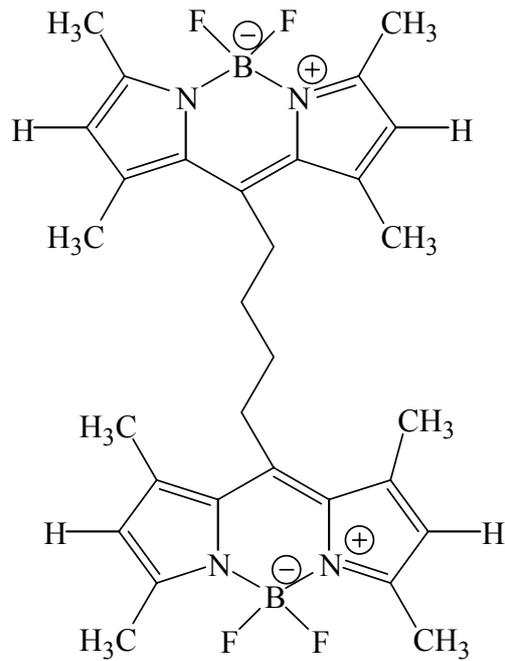


Abbildung 38: Dipyrromethen 546

Neben Pyrrol-Derivaten mit Alkylketten kann auch das Pyrrol eingesetzt werden. Bei der Reaktion von Pyrrol mit Oktansäurechloriden entstand ein, in gelöster Form nicht stabiler Fluoreszenzfarbstoff (vgl. Abbildung 39). Während der Synthese konnte mit Hilfe einer Schwarzlichtlampe der entstehende Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt werden, die aber nach mehreren Stunden verschwand.

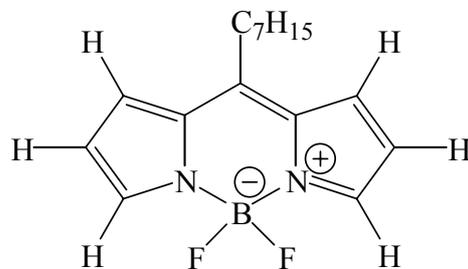


Abbildung 39: Pyrrolpyrromethen

Eine weitere Möglichkeit ergab sich, wenn Indol mit Oktansäurechlorid umgesetzt wurde, dabei entstand der Farbstoff „Indolpyrromethen“.

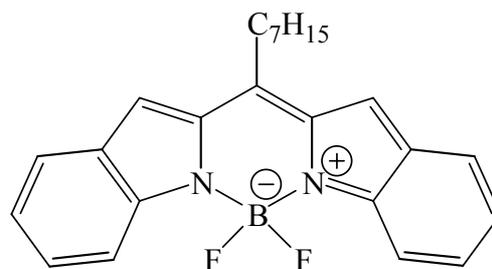


Abbildung 40: Indolpyrromethen

Die Synthese all dieser Farbstoffe erfolgte nach dem in Kapitel 4.2.3.3 (Allgemeine Einstufen-Synthese) beschriebenen Verfahren. Die Namensgebung nach IUPAC aller synthetisierter Farbstoffe erfolgt in Kapitel 9.

4.2.4.2 Eigenschaften der neuen Pyrromethen-Farbstoffe

Eine wesentliche Eigenschaft von Fluoreszenzfarbstoffen ist deren Absorption und Emission. Aus diesem Grund wurden von den Pyrromethen-Farbstoffen die Maxima der Absorption und Fluoreszenz in Ethanol bestimmt (vgl. Tabelle 10). Ferner wurde die Fluoreszenzabklingdauer der Farbstoffe in Ethanol bestimmt.

Tabelle 10: Absorptions-, Fluoreszenzwellenlängen und Fluoreszenzabklingdauer in Ethanol
 λ_{abs} : Absorptionswellenlänge, λ_{fl} : Fluoreszenzwellenlänge, τ : Fluoreszenzabklingdauer

| Farbstoff | λ_{abs} , nm | λ_{fl} , nm | τ , ns |
|-----------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| Pyrromethen 567 | 518 | 542 | 6,3 |
| Butylpyrromethen 567 | 520 | 540 | 6,3 |
| Pentylpyrromethen 567 | 520 | 536 | 6,3 |
| Hexylpyrromethen 567 | 520 | 536 | 6,2 |
| Heptylpyrromethen 567 | 521 | 537 | 6,1 |
| Pyrromethen 546 | 486 | 506 | 5,7 |
| Heptylpyrromethen 546 | 488 | 511 | 4,9 |
| Dipyrromethen 546 | 492 | 505 | 5,4 |
| Pyrrolpyrromethen | 492 | 504 | 6,4 |
| Indolpyrromethen | 393 | 427 | 4,9 |

Neben den spektralen Eigenschaften ist die Fluoreszenzquantenausbeute η_{Fl} ein wichtiger Parameter eines Farbstoffs. Sie wird durch das Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen n_E zur Anzahl der absorbierten Photonen n_A definiert:

$$\eta_{Fl} = \frac{n_E}{n_A} . \quad (19)$$

Neben der Struktur des Farbstoffmoleküls hängt die Quantenausbeute von Umgebungseinflüssen, wie Temperatur, Viskosität und Polarität des Lösungsmittels, ab. Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Unterschieden werden Methoden, bei denen die absoluten oder die relativen Quantenausbeuten ermittelt werden.

Die Bestimmung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeute kann kalorimetrisch erfolgen, z. B. durch die Messung der bei der strahlungslosen Desaktivierung des Anregungszustands freigesetzten Wärme. Eine elegante „kalorimetrische“ Methode ist das Thermal Blooming. Hierbei wird zur Detektion der abgegebenen Wärmemenge die Änderung des Brechungsindex der Lösung ausgenutzt [68, 69, 70]. Eine weitere Methode zur Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute besteht in der Relativmessung der Emission [71, 72]. Bei dieser Methode wird die Emission der zu untersuchenden Probe mit der einer Referenzsubstanz verglichen. Als Referenz sollte eine Substanz ausgewählt werden, deren Absorptions- und Emissionsspektrum im gleichen Bereich liegt wie die Spektren der zu bestimmenden Probe. Eine bekannte absolute Quantenausbeute ist ein weiteres Auswahlkriterium für die Vergleichssubstanz. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren von Probe und Referenz muss dabei unter identischen Bedingungen erfolgen. Um die Fehler beim Vergleich der Fluoreszenzspektren gering zu halten, dient als Anregungswellenlänge für die Fluoreszenz der Schnittpunkt der Absorptionsspektren. Durch die nachfolgende Abbildung soll dieses Prinzip verdeutlicht werden.

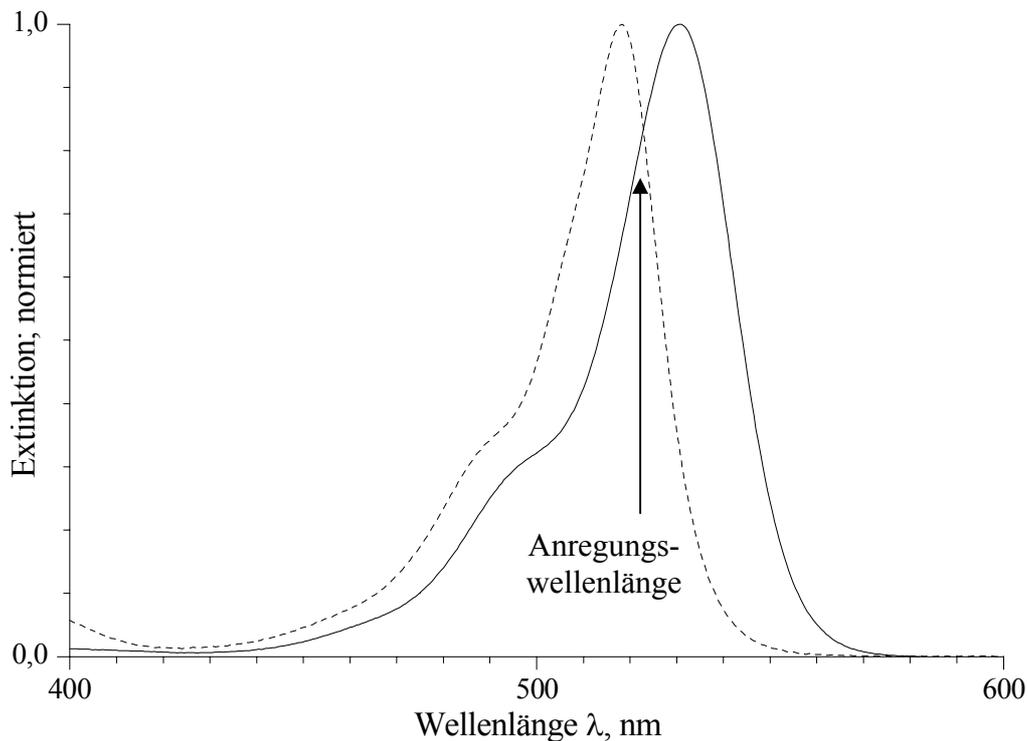


Abbildung 41: Ermittlung der Anregungswellenlänge für die Relativbestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute, —: Probe, ---: Referenz.

Bei der Aufnahme der Fluoreszenzspektren werden zunächst „Apparatespektren“ erhalten. Dabei sind diese durch die Wellenlängenabhängigkeit von Monochromator, Spiegeln und Detektor der Messapparatur beeinflusst. Die Korrektur der Apparatespektren erfolgt mit Korrekturfaktoren, die für die jeweilige Wahl der Polarisierung und des verwendeten Detektors

unterschiedlich sind. Die Korrekturfaktoren für den Detektor in Abhängigkeit von der Polarisation werden durch Vergleich mit einer geeichten Wolframlampe erhalten. Durch die Korrektur werden Fluoreszenzphotonenspektren erhalten. Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute kann auf zwei Weisen vorgenommen werden. Einen ersten Eindruck über die Fluoreszenzquantenausbeuten bietet das Verhältnis der Fluoreszenz an den Fluoreszenzmaxima. Aufgrund unterschiedlicher Lage und Form der Fluoreszenzspektren ist diese Methode jedoch stark fehlerbehaftet. Eine bessere Möglichkeit bietet der Flächenvergleich der Fluoreszenzphotonenspektren. Hierbei werden die Flächen von Probe F_P und Referenz F_R gegenübergestellt. Wurden die Fluoreszenzspektren von Probe und Referenz unter identischen Bedingungen registriert, d. h. gleiches Lösungsmittel und gleiche Extinktion bei der Anregungswellenlänge, so wird die Fluoreszenzquantenausbeute η_P der Probe nach folgender Gleichung erhalten:

$$\eta_P = \eta_R \cdot \frac{F_P}{F_R}. \quad (20)$$

Hierbei ist η_R die bekannte absolute Quantenausbeute der Referenzsubstanz.

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute durch Anregung am Schnittpunkt der beiden entsprechenden Absorptionsspektren birgt allerdings einige Schwierigkeiten. Da die Fluoreszenz direkt von der Absorption abhängt, ist es wichtig, dass die Anregung exakt am Schnittpunkt der Absorptionsspektren erfolgt. Aufgrund der Messgenauigkeit der verwendeten Geräte kann es zu Verschiebungen der Wellenlängen kommen. In der Regel erfolgt die Bestimmung der Absorption an einem Absorptionsspektralphotometer, hingegen wird die Emission mit einem Fluoreszenzphotometer aufgezeichnet. Dadurch kann es zu Wellenlängendifferenzen der Geräte zueinander kommen. Ein weiterer Grund für eine Verschiebung in der Wellenlänge ergibt sich, wenn die Absorption an den Maxima nicht gleich sind. Der resultierende Schnittpunkt wird stärker in das Absorptionsspektrum mit der schwächeren Extinktion verschoben. Durch eine falsche Anregungswellenlänge von 1 bis 2 nm kann es zu beachtlichen Fehlern bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute kommen. Diese Fehler können durchaus im Bereich zwischen 30 und 40 % liegen [73].

Für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten der Farbstoffe Pyrromethen 567, Butylpyrromethen 567, Pentylpyrromethen 567, Hexylpyrromethen 567 und Heptylpyrromethen 567 eignet sich der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G als Referenz. Für die Farbstoffe Pyrromethen 546, Heptylpyrromethen 546 und Dipyrromethen 546 kann der

Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein als Referenzsubstanz eingesetzt werden. Die so ermittelten Fluoreszenzquantenausbeuten sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Von einigen ausgewählten Farbstoffen wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten sowie die Extinktionskoeffizienten in Ethanol bestimmt. Wie der Tabelle 11 entnommen werden kann, zeigen die neuen Pyrromethen-Farbstoffe eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute, die in allen Fällen über 80 % liegt.

Tabelle 11: Fluoreszenzquantenausbeuten in Ethanol relativ zum Referenzfarbstoff Rhodamin 6G bei einer Anregung im Schnittpunkt der Absorptionsspektren. Die Fluoreszenzquantenausbeute der Referenzsubstanz wurde mit 95 % angesetzt [69].

| Farbstoff | $\eta, \%$ |
|--------------------------------|------------|
| Pyrromethen 567 | 86 |
| Butylpyrromethen 567 | 86 |
| Pentylpyrromethen 567 | 87 |
| Hexylpyrromethen 567 | 87 |
| Heptylpyrromethen 567 | 88 |
| Rhodamin 6G (Referenzsubstanz) | 100 |

Der Extinktionskoeffizient ε einer Substanz kann durch Absorptionmessungen ermittelt werden. Grundlage für die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten ist das Lambert-Beer'sche Gesetz.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d . \quad (21)$$

Hierbei steht E für die gemessene Extinktion, c für die Konzentration und d für die Schichtdicke. Zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten wird die Konzentration der zu bestimmenden Substanz benötigt. Die Konzentration ist durch Einwiegen der Substanz (etwa 1 mg auf 25 mL) und deren Molmasse zugänglich. Um möglichst genaue Werte zu erhalten, muss die Substanz vollständig gelöst sein. Von der Lösung wird dann das Absorptionsspektrum (Schichtdicke $d = 0,1$ cm) aufgezeichnet und die Extinktion E am Absorptionsmaximum aus dem Spektrum ermittelt. Durch das Lambert-Beer'sche Gesetz kann dann der Extinktionskoeffizient ermittelt werden.

Für die Farbstoffe ergaben sich folgende, in Tabelle 13 aufgelisteten Extinktionskoeffizienten. Wie zu ersehen, besitzen die Pentylpyrromethen-Farbstoffe im sichtbaren Bereich eine hohe Absorption und zusammen mit der hohen Fluoreszenzquantenausbeute erweisen sich diese Farbstoffe als gute Fluoreszenz-Sonden. Um zu überprüfen, ob sich die Farbstoffe auch gut mit einer Schwarzlichtlampe anregen lassen, wurde ebenfalls der Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 366 nm bestimmt. Das Ergebnis dieser Messungen kann der Tabelle 12 entnommen werden. Wie sich zeigt, besitzen die

Pyrrromethen-Farbstoffe auch im UV-Bereich eine hohe Absorption, was insbesondere auch der Vergleich mit dem Farbstoff Rhodamin 6G verdeutlicht.

Tabelle 12: Extinktionskoeffizienten bei 366 nm

| Farbstoff | ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹ |
|------------------------|---------------------------------------------------|
| Pyrrromethen 567 | 6600 |
| Butylpyrrromethen 567 | 8200 |
| Pentylpyrrromethen 567 | 6000 |
| Hexylpyrrromethen 567 | 6800 |
| Heptylpyrrromethen 567 | 6600 |
| Rhodamin 6G | 2400 |

Tabelle 13: Extinktionskoeffizienten am Absorptionsmaximum

| Farbstoff | ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹ |
|------------------------|---------------------------------------------------|
| Pyrrromethen 567 | 66000 |
| Butylpyrrromethen 567 | 88000 |
| Pentylpyrrromethen 567 | 62000 |
| Hexylpyrrromethen 567 | 78000 |
| Heptylpyrrromethen 567 | 74000 |

Experimente zur Löslichkeit ergaben die in Tabelle 14 wiedergegebenen Werte. Damit zeigt sich, dass das angestrebte Ziel, ein höchstkonzentriertes Fluoreszenzfarbstoffkonzentrat zu realisieren, mit den neuen Farbstoffen verwirklicht werden kann. So konnte mit dem Farbstoff Heptylpyrrromethen 567 ein Konzentrat hergestellt werden, dessen Fluoreszenz selbst nach einer 2000-fachen Verdünnung mit Mineralöl noch gut sichtbar ist.

Tabelle 14: Löslichkeit der neuen Pyrrromethen-Farbstoffe in Rapsmethylester

| Farbstoff | mg/mL |
|------------------------|-------|
| Butylpyrrromethen 567 | 300 |
| Pentylpyrrromethen 567 | 325 |
| Hexylpyrrromethen 567 | 366 |
| Heptylpyrrromethen 567 | 375 |

Mit Hilfe von Ubbelohden-Viskosimetern wurden die Viskositäten vor und nach Zugabe von Farbstoffen zum Rapsmethylester bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die Viskositäten bei diesen geringen Zugabemengen nicht änderten.

4.3 Zusammenfassung

Ein Leitgedanke dieses Kapitels war, neue, maßgeschneiderte, hochöllösliche Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoffkonzentrate zu synthetisieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, basieren auf einem Pyrromethen-Gerüst. Die verwendeten Synthesevorschriften nach [61, 62] konnten modifiziert und optimiert werden. Die Synthese wurde dahingehend abgeändert, dass im Gegensatz zu den bereits bekannten Pyrromethenen, welche nur in geringem Maße öllöslich sind, hochöllösliche Farbstoffe entwickelt werden konnten.

Die neu synthetisierten Farbstoffe zeichnen sich durch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute aus, die in allen Fällen über 80 % liegt. Gepaart mit einer starken Absorption im sichtbaren Spektralbereich repräsentieren diese Farbstoffe gute Fluoreszenzsonden. Des Weiteren sind die neuen Farbstoffe, aufgrund ihrer starken Absorption im UV-Bereich, auch ideal für eine Anregung mit Schwarzlichtlampen geeignet, dabei liegt die Fluoreszenz im Wellenlängenbereich zwischen 500 und 545 nm und wird daher sehr gut mit dem bloßen Auge erkannt.

Was die Löslichkeit der neuen Farbstoffe betrifft, so konnten basierend auf den neuen Pyrromethen-Farbstoffen, Fluoreszenzfarbstoff-Konzentrate realisiert werden, deren Fluoreszenz selbst nach einer 2000-fachen Verdünnung mit Mineralöl noch gut sichtbar ist.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Synthesebedingungen so optimiert, dass Ressourcen durch geringen Lösungsmittelverbrauch geschont werden können. In diesem Zusammenhang konnte durch eine optimierte Darstellung der Farbstoff Heptylpyrromethen 567 sogar in einer „Eintopf-Synthese“ im Kilogramm-Maßstab synthetisiert werden.

5 Liste der Abkürzungen

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|
| APD: | Avalanche Photodiode |
| CCE: | Chirale Kapillarelektrophorese |
| CGE: | Kapillargelelektrophorese |
| CZE: | Kapillarzonenelektrophorese |
| EOF: | Elektroosmotischer Fluss |
| FCS: | Fluorescencecorrelationsspectroscopy, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie |
| FWHM: | Full width half maximum |
| IC: | Internal conversion |
| IEF: | Isoelektrische Fokussierung |
| IRF: | Instrumental response function, Instrumentenfunktion |
| ISC: | Intersystem crossing |
| ITP: | Isotachosphorese |
| IUPAC: | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| MCS: | Multichannel-Scaler |
| MEKC: | Mizellare elektrokinetische Chromatographie |
| MLE: | Maximum likelihood estimator |
| PAGE: | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| TCSPC: | Time correlated single-photon counting, Zeitkorrelierte Einzelphotonen-Zählung |
| VbF: | Verordnung über brennbare Flüssigkeiten |

6 Literaturverzeichnis

- [1] Wöhrle, D.; Tausch, M.W.; Stohrer, W.-D.; Photochemie Konzepte, Methoden, Experimente, Wiley-VCH Weinheim, 1998, S. 231
- [2] James, F.A.J.L., The conservation of energy, theories of absorption and resonating molecules, 1851 – 1854 in Stokes, G.G.; Angström, A.J. and Thomson, W., Notes and Records Roy. Soc. London 38 (1), 1983, S. 79 – 107
- [3] Drexhage, K.H.; Universität Siegen; Privatmitteilung
- [4] Römpp Chemielexikon, 9. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 1992, S. 3871
- [5] Cook, M.J.; Thomson, A.J., Chem. Ber. 20 (1984), S. 914
- [6] Langhals, H.; Nachr. Chem. Tech. Lab.; 28 (1980), S. 716
- [7] Seybold, G.; Wagenblast, G.; Dyes and Pigments, 11 (1989), S. 303
- [8] Schügerl, K.; Analytische Methoden in der Biotechnologie, 1991, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, S. 132 ff
- [9] Melamed, M.R.; Mullaney, P.F.; Mendelsohn, M.L.; Flowcytometrie and sorting, 1979, Wiley and Son, New York
- [10] Shapiro, H.M.; Practical flow cytometrie; Alan, R. Liss in New York, 1985
- [11] Sutherland, R.M.; Dähne, C.; IRS (Internal Reflection Spectroscopy) devices for optical immunoassay; Biosensors. Fundamentals and Applications, (eds.: Turner, A.P.F.; Karube, I; Wilson, G.S., 1987, S. 655 – 678
- [12] Kronick, M.N.; Little, W.A.; A new immunoassay based on fluorescence excitation by internal reflection spectroscopy; J. Immunol. Methods, 1975, 8, S. 235 – 240
- [13] Lewis, G.N.; Kasha, M.; J. Am. Chem. Soc. 66, 2100 (1944)
- [14] Kasha, M.; Discuss, Faraday Soc. 9 (14), 1950
- [15] Kasha, M., Radiat. Res. Suppl. 2 (243), 1960
- [16] Von Büнау, G.; Wolff, T.; Photochemie Grundlagen, Methoden, Anwendungen; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim – New York, 1987, S. 266ff
- [17] Wöhrle, D.; Tausch, M.W.; Stohrer, W.-D.; Photochemie, Konzepte, Methoden, Experimente; Wiley-VCH, Weinheim, 1998, S. 63

-
- [18] Wöhrle, D.; Tausch, M.W.; Stohrer, W.-D.; Photochemie Konzepte, Methoden, Experimente, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, S. 42
- [19] Thiel, E.; Eigenschaften angeregter Rhodamin-Farbstoffe und deren Wirkung im Farbstofflaser; Habilitationsschrift, 1995, S. 54ff
- [20] Wöhrle, D.; Tausch, M.W.; Stohrer, W.-D.; Photochemie, Konzepte, Methoden, Experimente; Wiley-VCH, Weinheim, 1998, S. 340
- [21] DIN 5031 Teil 3; Strahlenphysik im optischen Bereich und Lichttechnik; Größen, Formelzeichen und Einheiten der Lichttechnik, März 1982
- [22] Schmidt, Werner; Optische Spektroskopie, Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker, VCH, Weinheim, 1994, S. 66
- [23] Wöhrle, D.; Tausch, M.W.; Stohrer, W.-D.; Photochemie, Konzepte, Methoden, Experimente; Wiley-VCH, Weinheim, 1998, S. 329
- [24] Firma Hamamatsu, Produktinformation zu Photomultiplier Tubes (PMTs)
- [25] Bergmann, Schaefer, Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3, 9. Auflage, Optik, S. 227
- [26] Atkins, P.W.; Physikalische Chemie; VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1987), S. 5
- [27] Campbell, J.A.; Allgemeine Chemie, Verlag Chemie, Weinheim (1979), S. 37ff
- [28] Reif, F.; Statistische Physik und Theorie der Wärme, 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin – New York (1985), S. 101ff
- [29] Petermann, K.; Laser diode modulation and noise, 1998, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht
- [30] Ko, D.S.; Nord, S.; Sauer, M.; Wolfrum, J., J. Opt. Soc. Korea 1997, 8, 42 – 46
- [31] Schmidt, Werner; Optische Spektroskopie, Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker, VCH, Weinheim, 1994, S. 75
- [32] Wöhrle, D.; Tausch, M.W.; Stohrer, W.-D.; Photochemie, Konzepte, Methoden, Experimente; Wiley-VCH, Weinheim, 1998, S. 326
- [33] Becker, H.G.O., Einführung in die Photochemie, 2. Auflage, 1983, Thieme Verlag Stuttgart, S. 106

- [34] Becker, W.; Hickl, H.; Zander, C.; Drexhage, K.H.; Sauer, M.; Siebert, S.; Wolfrum, J., *Rev. Sci. Instrum.* 1999, 70, S. 1835 – 1841
- [35] Tellinghuisen, J.; Wilkerson Jr., C.W.; *Anal. Chem.* 1993, 65, S. 1240
- [36] Sauer, M.; Universität Heidelberg; Privatmitteilung
- [37] Aragón, S.R.; Pecora, R.; *Fluorescence Correlation Spectroscopy as a Probe of Molecular Dynamics*; *J. Chem. Phys.* 1976 (64), S. 1791 – 1803
- [38] Reuss, F.F.; *Mém. Soc. Impér. Natural, Moskau*, 2, 1809, S. 327
- [39] Picton, H.; Lindner, S.E.; *J. chem. Soc.*, 61 (1892), S. 148
- [40] Wieland, T.; Fischer, E.; *Naturwissenschaften*, 35 (1958), S. 29
- [41] Smithies, O.; *Biochem. J.*; 61 (1955), S. 629
- [42] Tiselius, A.; *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups.*, Ser. IV 7 (Nr. 4), 1930, S. 1
- [43] Raymond, S.; Weintraub, L.; *Science*, 130 (1959), S. 711
- [44] Hjertén, S.; *Biochem. Biophys. Acta*, 53 (1961), S. 514
- [45] Hjertén, S.; *Free Zone Electrophoresis*; *Chromatogr. Rev.* 9 (1967), S. 122 – 219
- [46] Virtanen, R.; *Zone Electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection*, *Acta Polytech. Scand.*; 123 (1974), S. 1 – 67
- [47] Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, Th.P.E.M.; *J. Chromatogr.* 169 (1979), S. 11
- [48] Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.; *J. Chromatogr.*, 218 (1981), S. 209
- [49] Walbroehl, Y.; Jorgenson, J.W.; *On-Column UV Absorption Detector for Open Tubular Capillary Zone Electrophoresis*; *J. Chromatogr.* 315 (1984), S. 135 – 143
- [50] Schügerl, K.; *Analytische Methoden in der Biotechnologie*, 1991, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, S. 139
- [51] Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.; *Kapillarelektrophorese*, 1994, Vieweg Braunschweig / Wiesbaden, S. 34
- [52] Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.; *Kapillarelektrophorese*, 1994, Vieweg Braunschweig / Wiesbaden, S. 11
- [53] Lukacs, K.D.; Jorgenson, J.W.; *HRC*, 8, 407 (1985)

- [54] Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.; Kapillarelektrophorese, Vieweg, Braunschweig / Wiesbaden, 1994, S. 102
- [55] Kessel, C.R.; Granick, S.; Langmuir 1991, 7, S. 532 – 538
- [56] Silberzan, P.; Léger, L.; Ausseré, D.; Benattar, J.J.; Langmuir 1991, 7, S. 1647 – 1651
- [57] Atkins, P.W.; Physikalische Chemie, 1. Auflage 1987, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 695
- [58] DIN 50320; Verschleiß; Begriffe; Systemanalyse von Verschleißvorgängen; Gliederung des Verschleißgebietes, Beuth Verlag, Berlin, 1979
- [59] Firma Tracto-Technik GmbH Spezialmaschinen, D-57368 Lennestadt, Privatmitteilung, 2002
- [60] Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry, 6th Edition, 2001: Stichwort: Fluoreszenzfarbstoffe, Laser Dyes
- [61] Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.L.; Wolford, L.T.; Boyer, J.H.; Pyrromethene-BF₂ Complexes as Laser Dyes: I; Heteroatom. Chemistry, 1 (5), 1990, S. 389 – 399
- [62] Boyer, J.H.; Haag, A.M.; Sathyamoorthi, G.; Soong, M.L.; Thangaraj, K.; Pyrromethene-BF₂ Complexes as Laser Dyes: 2; Heteroatom. Chemistry, 4 (1), 1993, S. 39 – 49
- [63] Latscha, HP.; Klein, G.; Analytische Chemie, 3. Auflage 1995, Springer-Verlag Berlin, S. 197
- [64] Firma Klüber Lubrication München KG, D-81379 München, Privatmitteilung, 2002
- [65] Kang, Haugland (Molecular Probes), Chemically reactive dipyrrometheneboron difluoride dyes, US Patent 4,774,339 (27.08.1988)
- [66] Kang, Haugland (Molecular Probes), Ethenyl-substituted dipyrrometheneboron difluoride dyes and their synthesis, US Patent 5,187,288 (16.02.1993)
- [67] Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.L.; Wolford, L.T.; Boyer, J.H.; Pyrromethene-BF₂ Complexes as Laser Dyes: I; Heteroatom. Chemistry, 1 (5), 1990, S. 389 – 399
- [68] Sens, R.; Strahlungslose Desaktivierung in Xanthen-, Oxazin und Carbazinfarbstoffen, Dissertation, Universität-Gesamthochschule Siegen, 1984
- [69] Zander, C.; Abkühlung einer Farbstofflösung durch Anti-Stokes-Fluoreszenz, Dissertation, Universität-Gesamthochschule Siegen, 1991

- [70] Demas, J.N.; Crosby, G.A.; J. Phys. Chem., 75 (1971), S. 991
- [71] Schmidt, W.; Optische Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994, S. 288
- [72] Arden-Jacob, J.; Neue langwellige Xanthen-Farbstoffe für Fluoreszenzsonden und Farbstofflaser, Shaker Verlag, Aachen 1993
- [73] Drexhage, K.H.; Universität Siegen; Privatmitteilung

7 Anhang

7.1 Spektren der eingesetzten Filter

7.1.1 Anregungsfilter

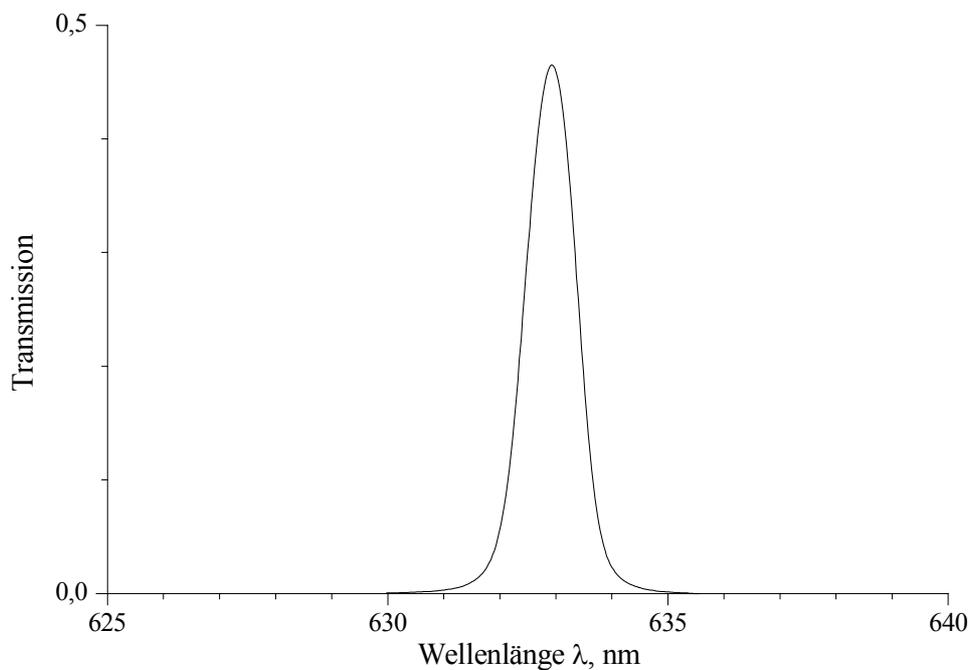


Abbildung 42: Transmission des Anregungsfilters 03FIL006; Omega Optical Inc.; Brattleboro, VT. USA

7.1.2 Fluoreszenzfilter

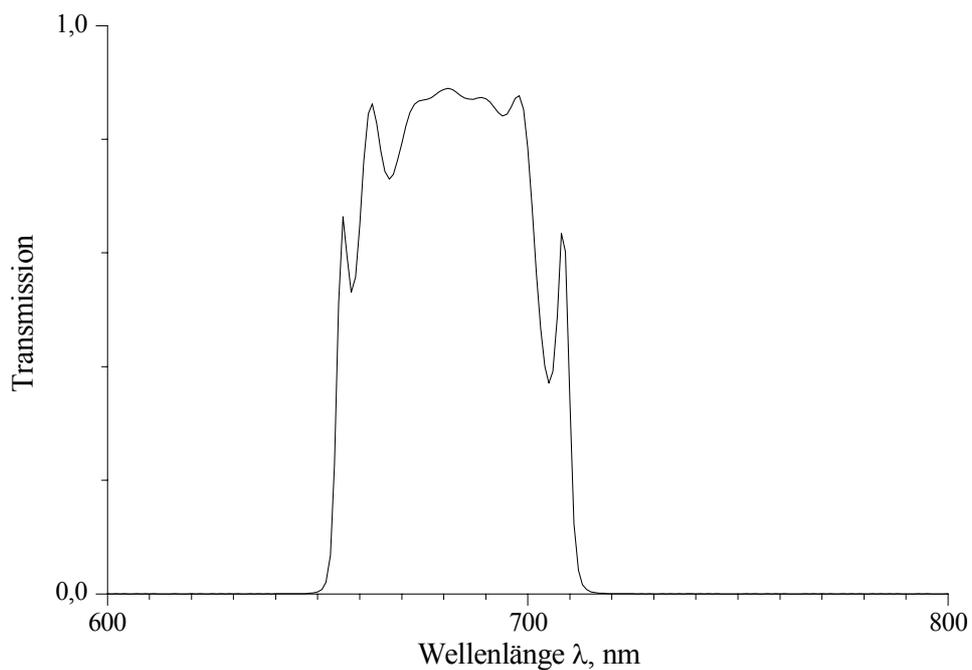


Abbildung 43: Transmission des Fluoreszenzfilters 650REFLP; Omega Optical Inc.; Brattleboro, VT. USA

7.1.3 Bandpassfilter

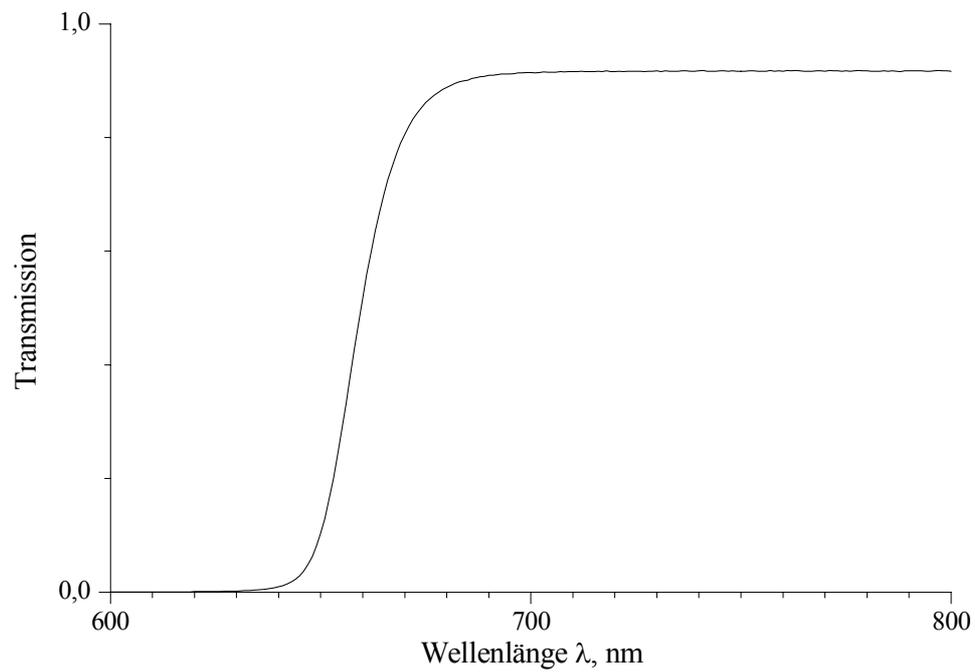


Abbildung 44: Transmission des Bandpassfilters RG665; Schott

7.1.4 Kombination Fluoreszenzfilter – Bandpassfilter

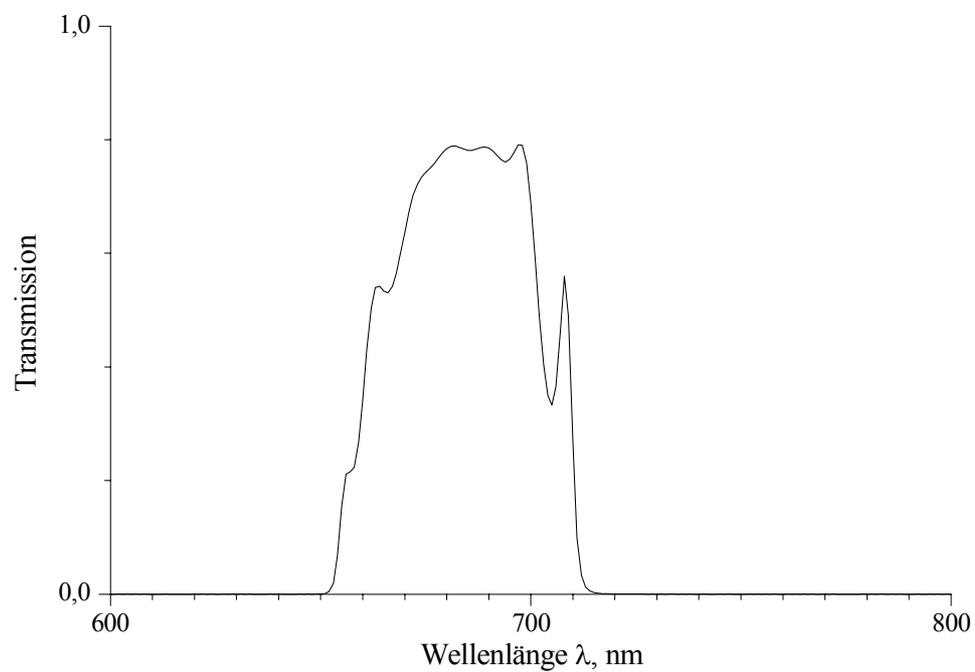


Abbildung 45: Transmission der Kombination vom Fluoreszenzfilter 03FIL006 und vom Bandpassfilter RG665

8 Strukturen und spektrale Daten

In diesem Anhang sind die Strukturen sowie die spektralen Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe wiedergegeben. Zu den spektralen Daten zählen Absorptions-, Emissionsspektren sowie die Abklingdauern der Farbstoffe. Bei den Emissionsspektren handelt es sich um Photonenspektren. Zur Strukturaufklärung der synthetisierten Farbstoffe wurde die Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR-Spektroskopie) herangezogen. Es wurden Protonenspektren (^1H -NMR-Spektren) in Deuteriochloroform angefertigt. Die Extinktionsspektren wurden mit einem Perkin Elmer Lambda 19 aufgenommen und beziehen sich auf eine Schichtdicke von 1 mm.

8.1 Farbstoffe der Elektrophorese-Experimente

8.1.1 HIDCI: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanin Iodid

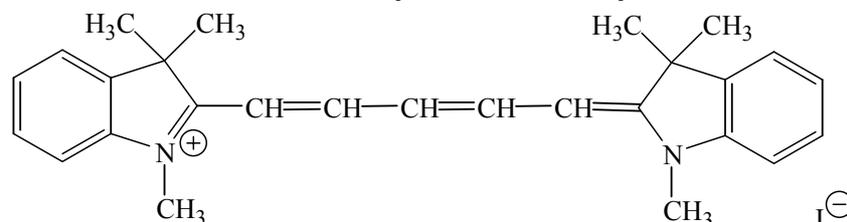


Abbildung 46: Struktur HIDCI

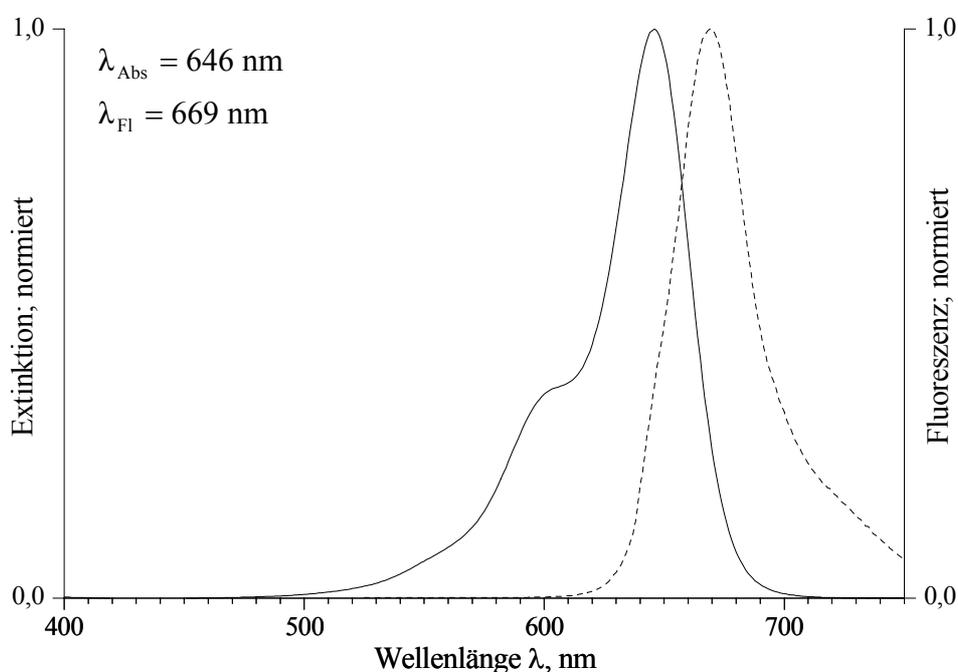
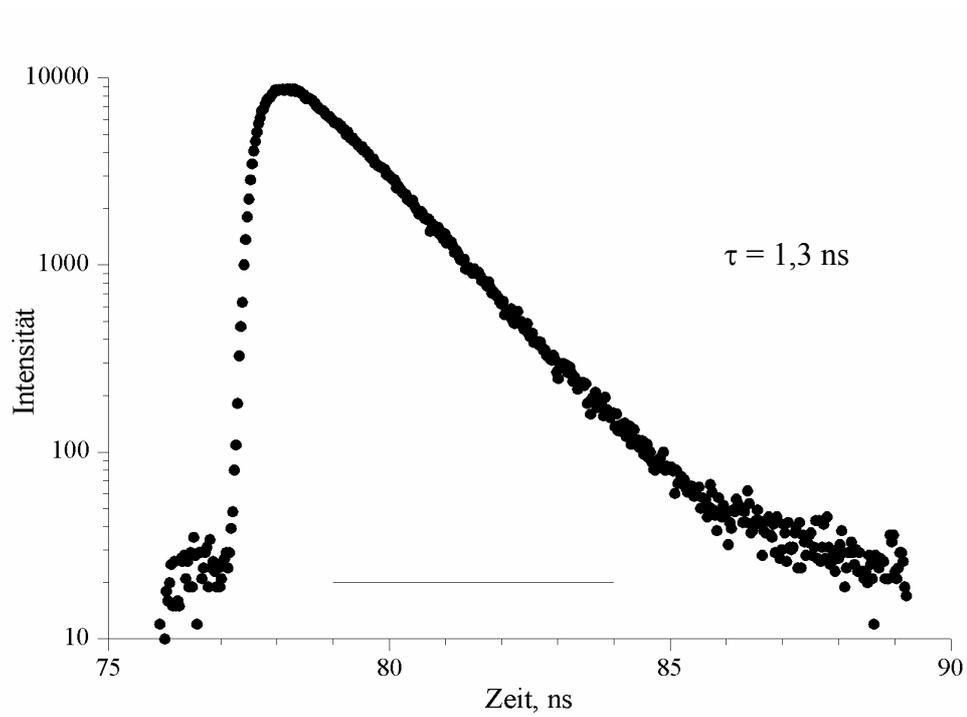
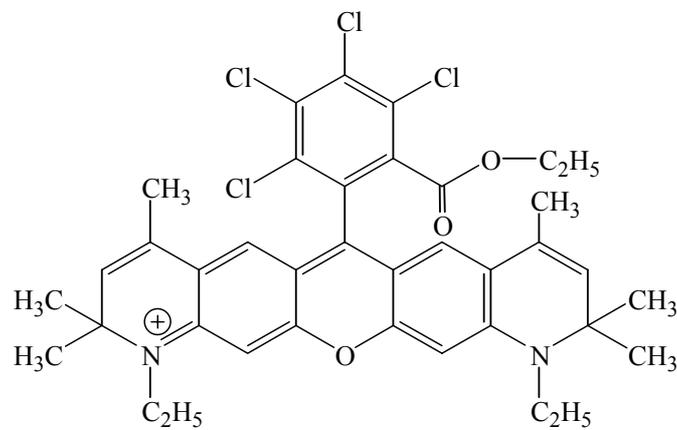


Abbildung 47: Absorptions-, Emissionsspektrum HIDCI in Ethylenglykol



8.1.2 JA22E



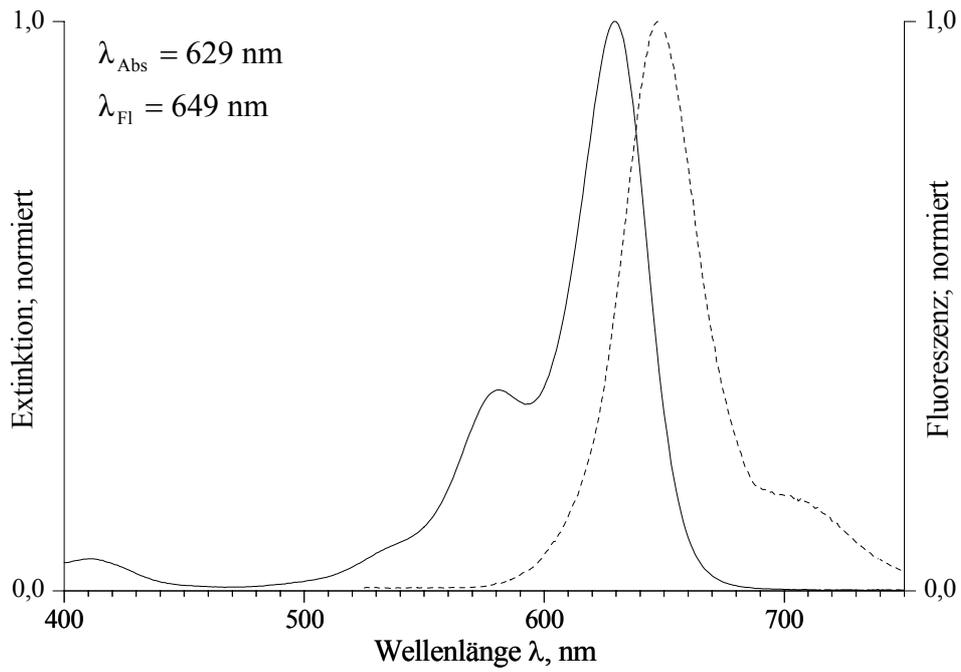
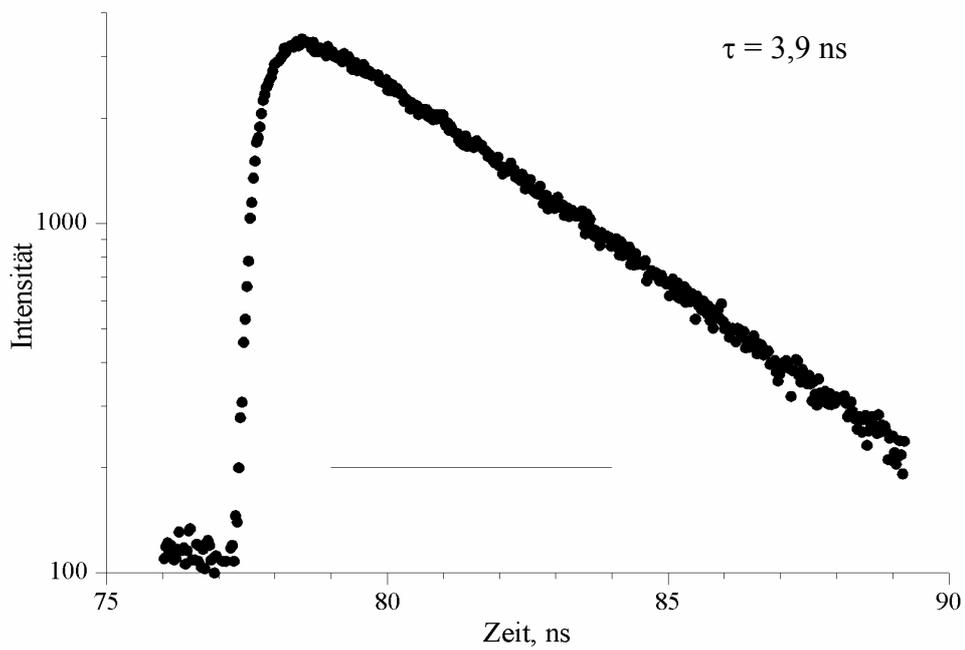


Abbildung 50: Absorptions-, Emissionsspektrum JA22E in Ethylenglykol

Abbildung 51: Fluoreszenzabklingkurve von JA22E in Ethylenglykol, Konzentration: 10^{-6} mol/L

8.1.3 JA33

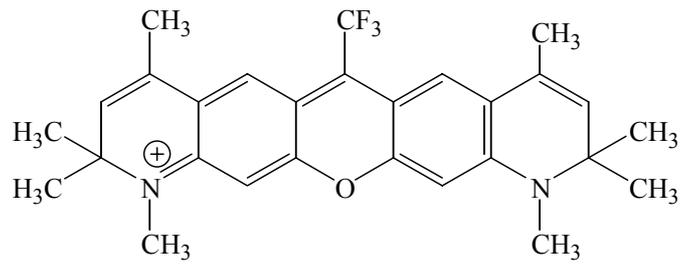


Abbildung 52: Struktur JA33

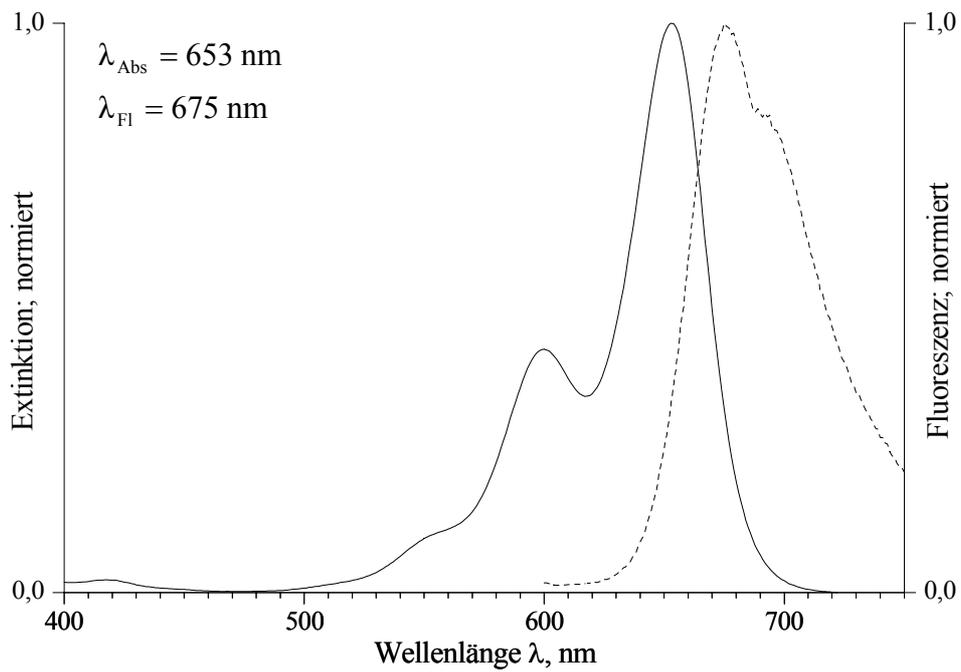


Abbildung 53: Absorptions-, Emissionsspektrum JA33 in Ethylenglykol

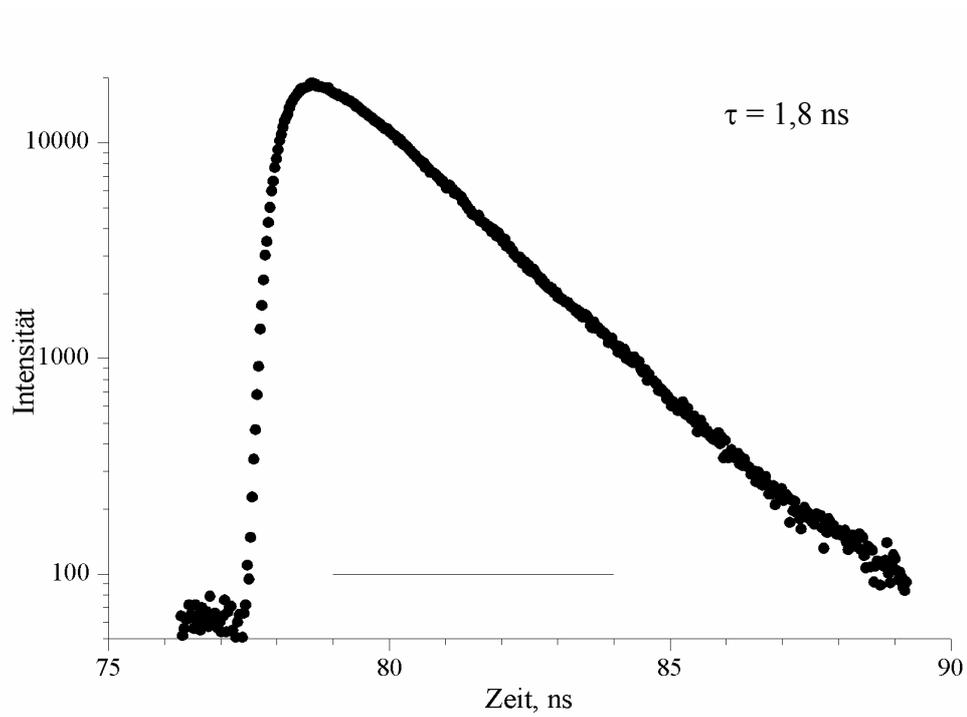


Abbildung 54: Fluoreszenzabklingkurve von JA33 in Ethylenglykol, Konzentration: 10^{-6} mol/L

8.1.4 JA34

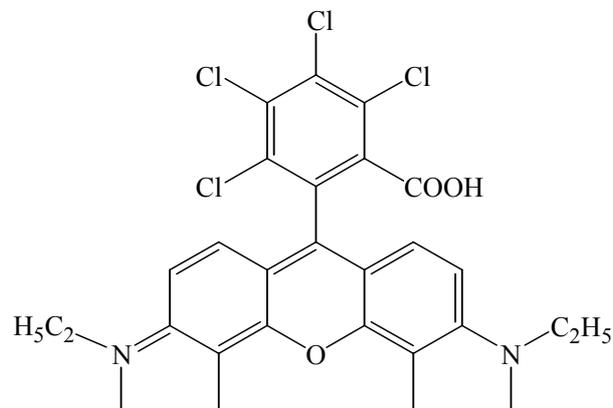


Abbildung 55: Struktur JA34

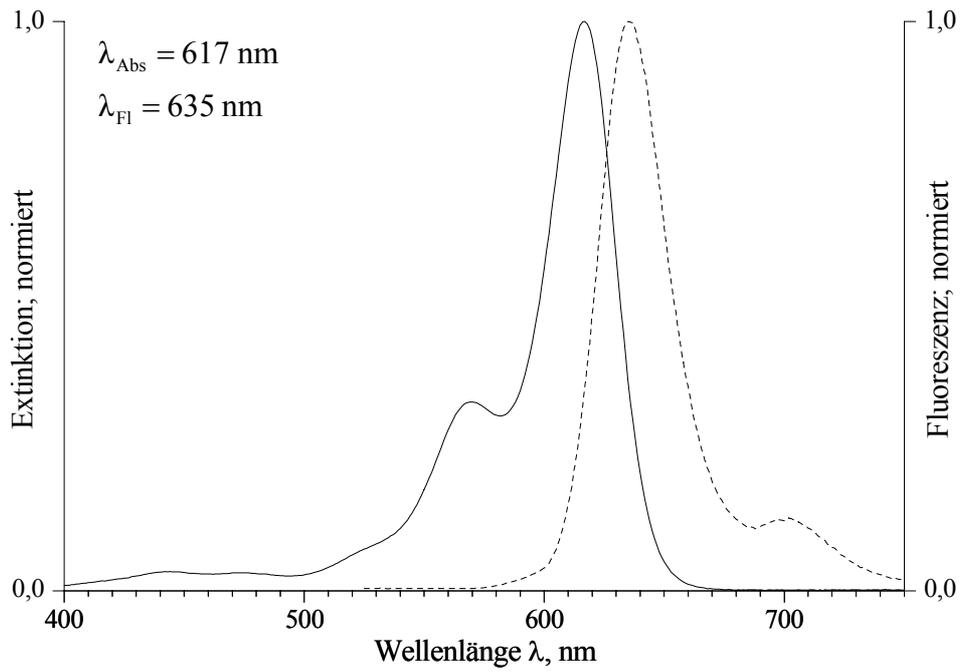
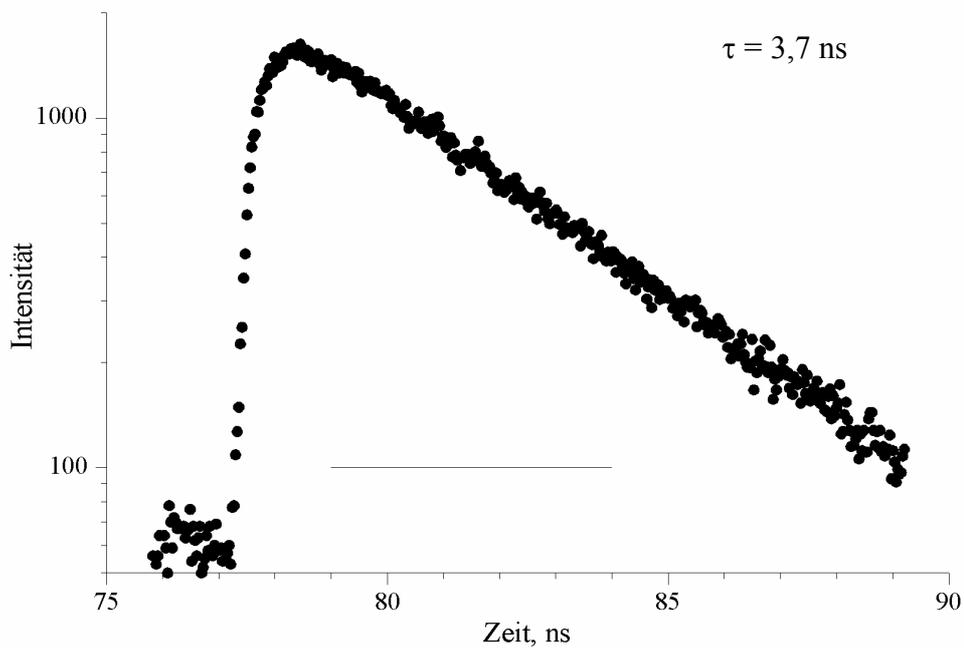


Abbildung 56: Absorptions-, Emissionsspektrum JA34 in Ethylenglykol (neutral)

Abbildung 57: Fluoreszenzabklingkurve von JA34 in Ethylenglykol (neutral), Konzentration: 10^{-6} mol/L

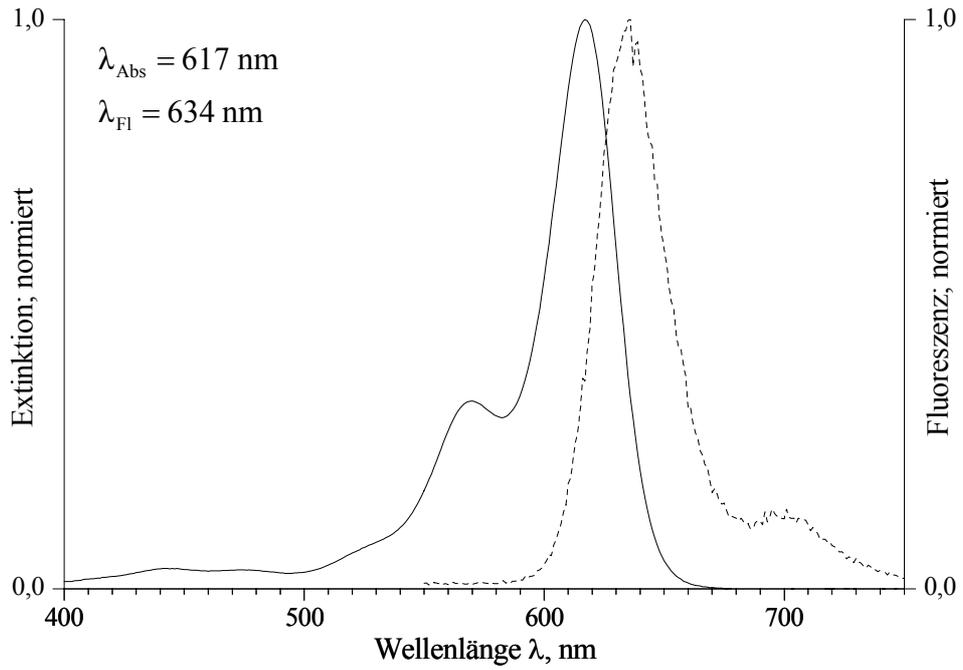


Abbildung 58: Absorptions-, Emissionsspektrum JA34 in Ethylenglykol (basisch)

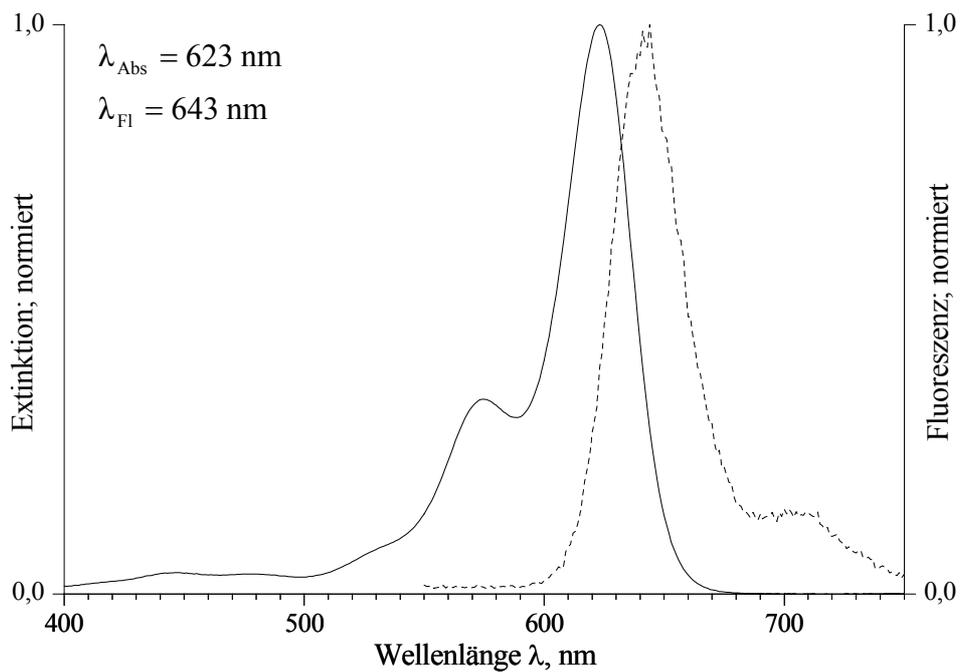


Abbildung 59: Absorptions-, Emissionsspektrum JA34 in Ethylenglykol (sauer)

8.2 Pyrromethen-Farbstoffe

8.2.1 Pyrromethen 567

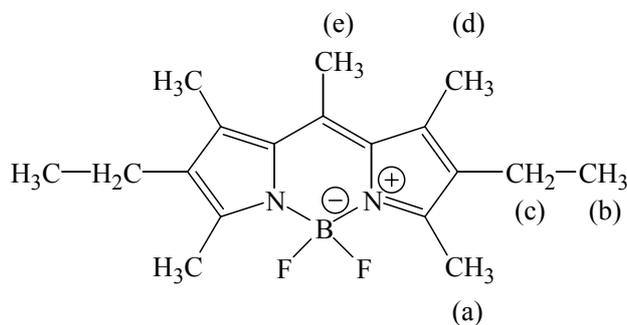


Abbildung 60: Struktur Pyrromethen 567

Tabelle 15: $^1\text{H-NMR}$ -Daten in Deuteriochloroform von Pyrromethen 567

| Chem. Verschiebung δ , ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|--------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 1,0 | t | 6 H | (b) |
| 2,3 | s | 6 H | (d) |
| 2,4 | q | 4 H | (c) |
| 2,5 | s | 6 H | (a) |
| 2,6 | s | 3 H | (e) |

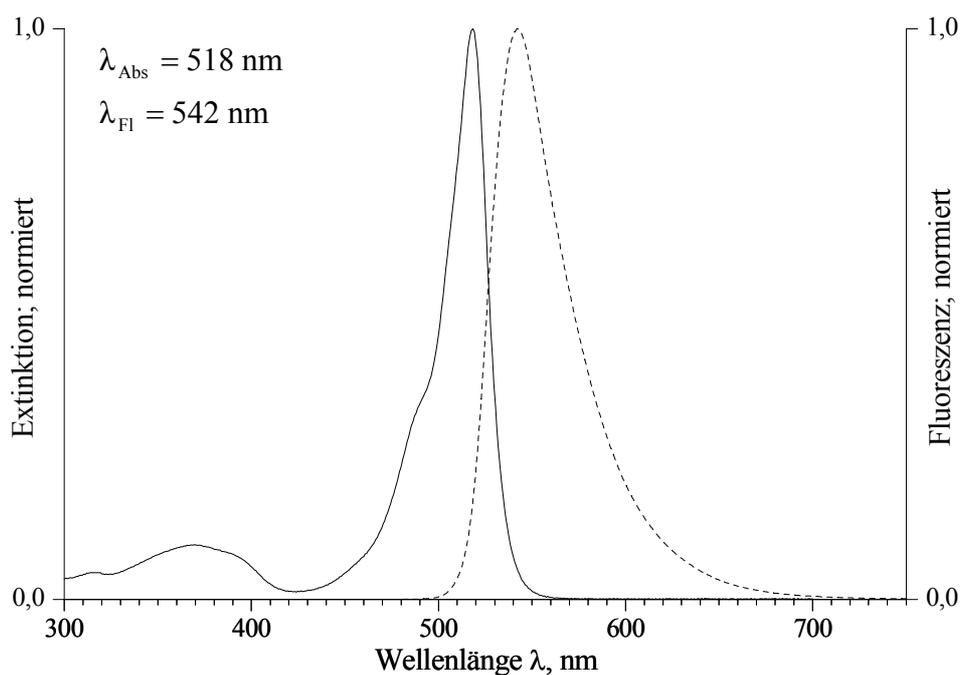


Abbildung 61: Absorptions-, Emissionsspektrum Pyrromethen 567 in Ethanol

8.2.2 Vorprodukt zu Pyrromethen 567

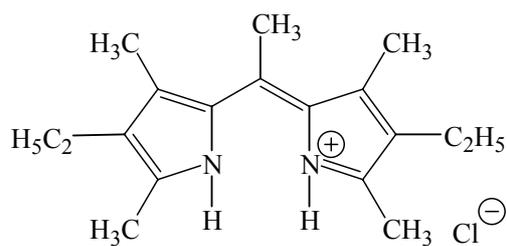


Abbildung 62: Vorprodukt zu Pyrromethen 567

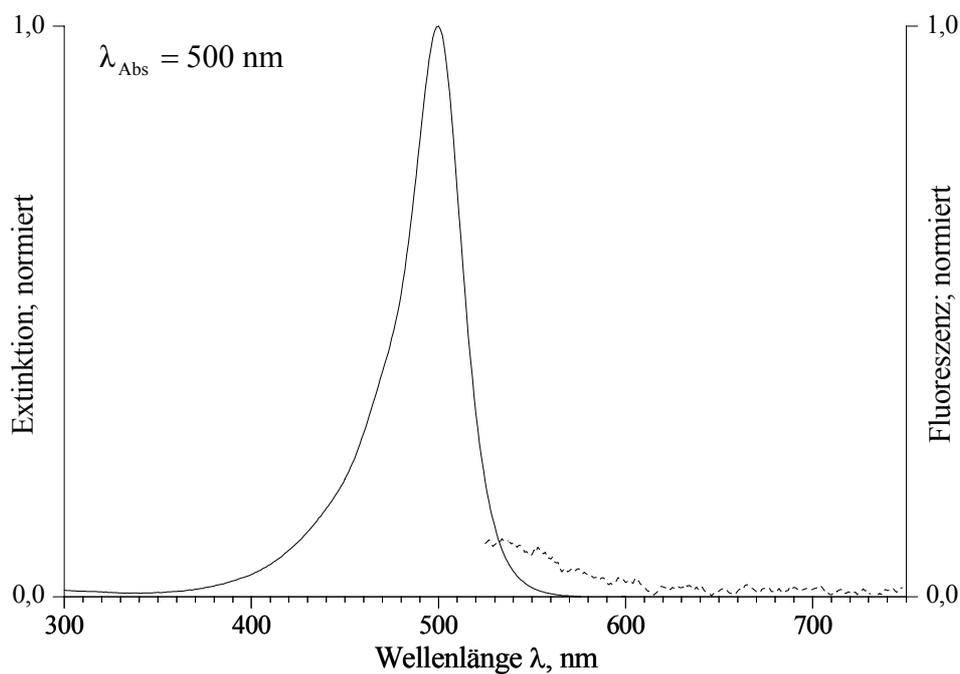


Abbildung 63: Absorptions-, Emissionsspektrum Vorstufe zu Pyrromethen 567 in Ethanol

8.2.3 Butylpyrromethen 567

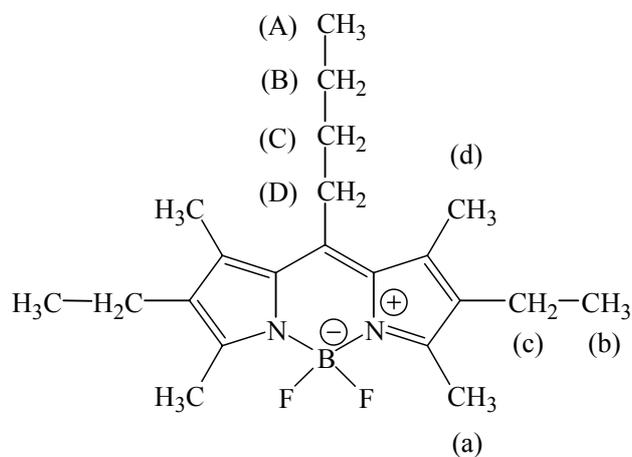


Abbildung 64: Struktur Butylpyrromethen 567

Tabelle 16: $^1\text{H-NMR}$ -Daten in Deuteriochloroform von Butylpyrromethen 567

| Chem. Verschiebung δ , ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|--------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 0,9 | t | 3 H | (A) |
| 1,0 | t | 3 H | (b) |
| 1,5 | m | 2 H | (B) |
| 1,6 | m | 2 H | (C) |
| 2,3 | s | 6 H | (d) |
| 2,4 | q | 4 H | (c) |
| 2,5 | s | 6 H | (a) |
| 3,0 | t | 2 H | (D) |

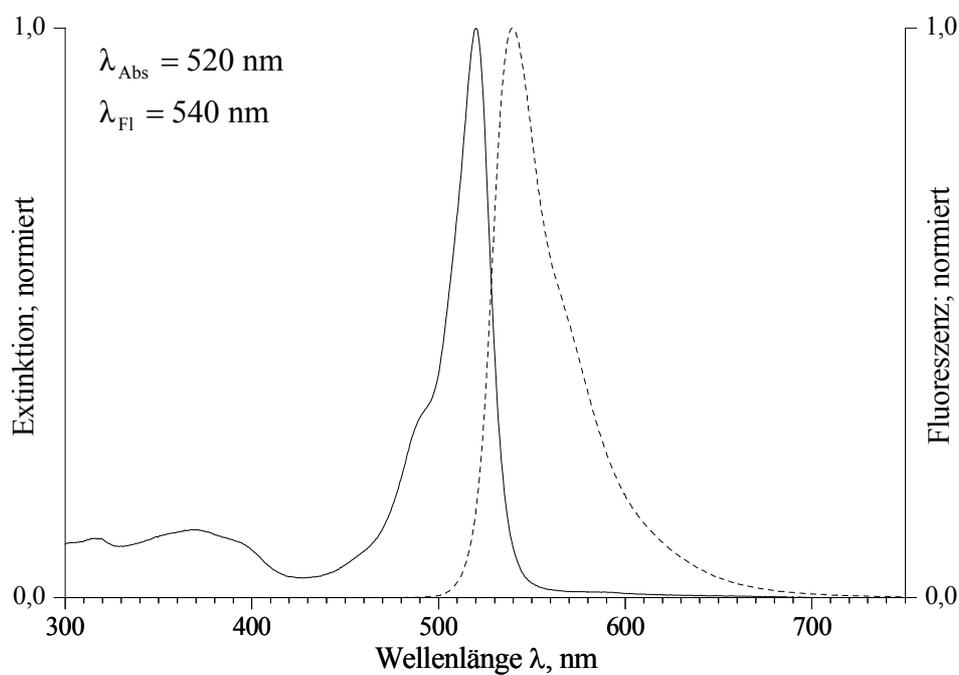


Abbildung 65: Absorptions-, Emissionsspektrum Butylpyrromethen 567 in Ethanol

8.2.4 Pentylpyrromethen 567

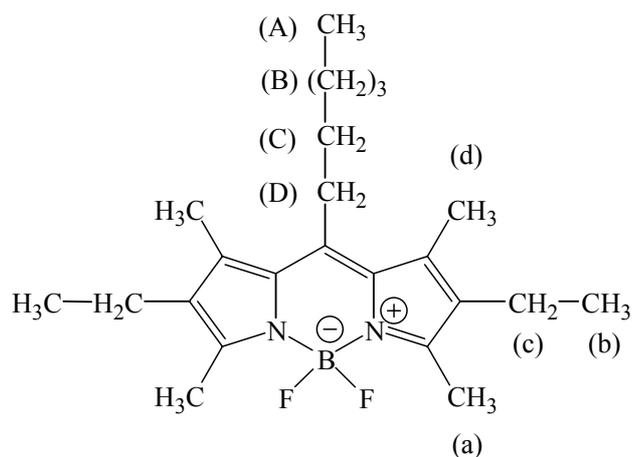


Abbildung 66: Struktur Pentylpyrromethen 567

Tabelle 17: ¹H-NMR-Daten in Deuteriochloroform von Pentylpyrromethen

| Chem. Verschiebung δ , ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|--------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 0,9 | t | 3 H | (A) |
| 1,0 | t | 6 H | (b) |
| 1,5 | m | 4 H | (B) |
| 1,6 | m | 2 H | (C) |
| 2,3 | s | 6 H | (d) |
| 2,4 | q | 4 H | (c) |
| 2,5 | s | 6 H | (a) |
| 3,0 | t | 2 H | (D) |

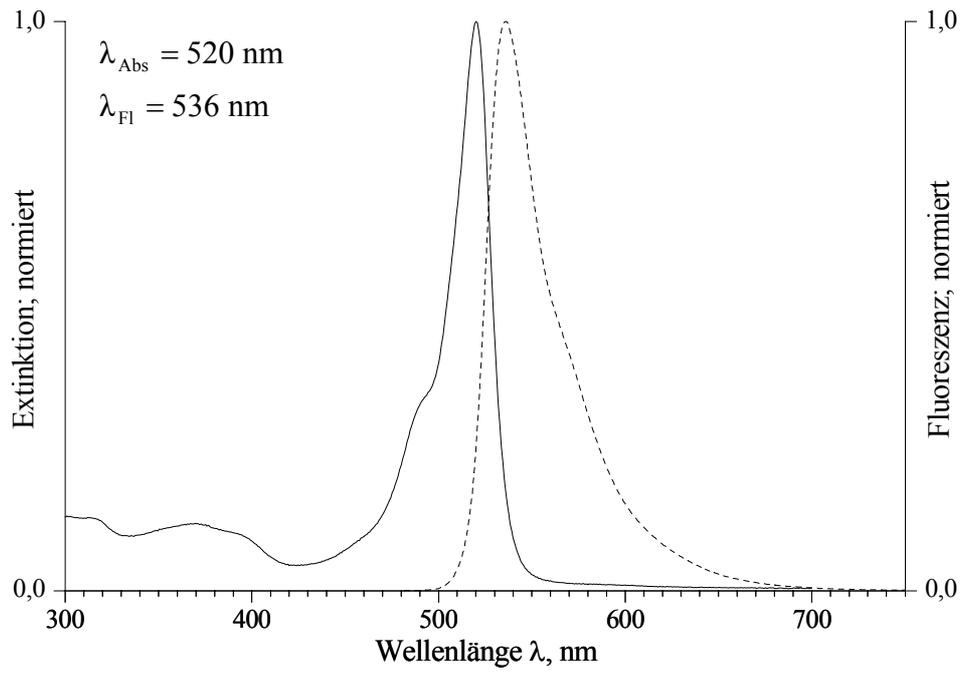


Abbildung 67: Absorptions-, Emissionsspektrum Pentylpyromethen 567 in Ethanol

8.2.5 Hexylpyrromethen 567

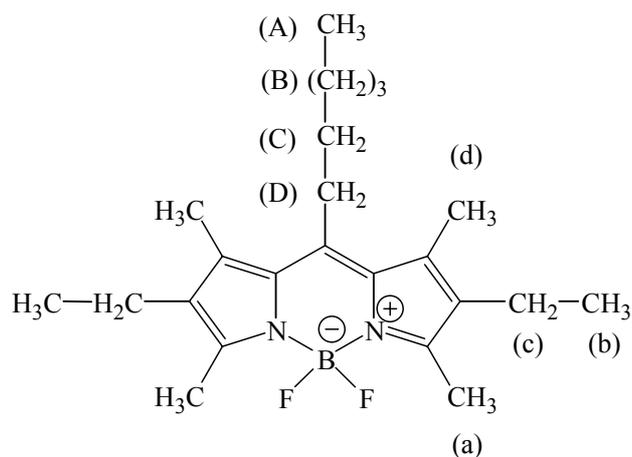


Abbildung 68: Struktur Hexylpyrromethen 567

Tabelle 18: ^1H -NMR-Daten in Deuteriochloroform von Hexylpyrromethen

| Chem. Verschiebung δ , ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|--------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 0,9 | t | 3 H | (A) |
| 1,0 | t | 3 H | (b) |
| 1,5 | m | 6 H | (B) |
| 1,6 | m | 2 H | (C) |
| 2,3 | s | 6 H | (d) |
| 2,4 | q | 4 H | (c) |
| 2,5 | s | 6 H | (a) |
| 3,0 | t | 2 H | (D) |

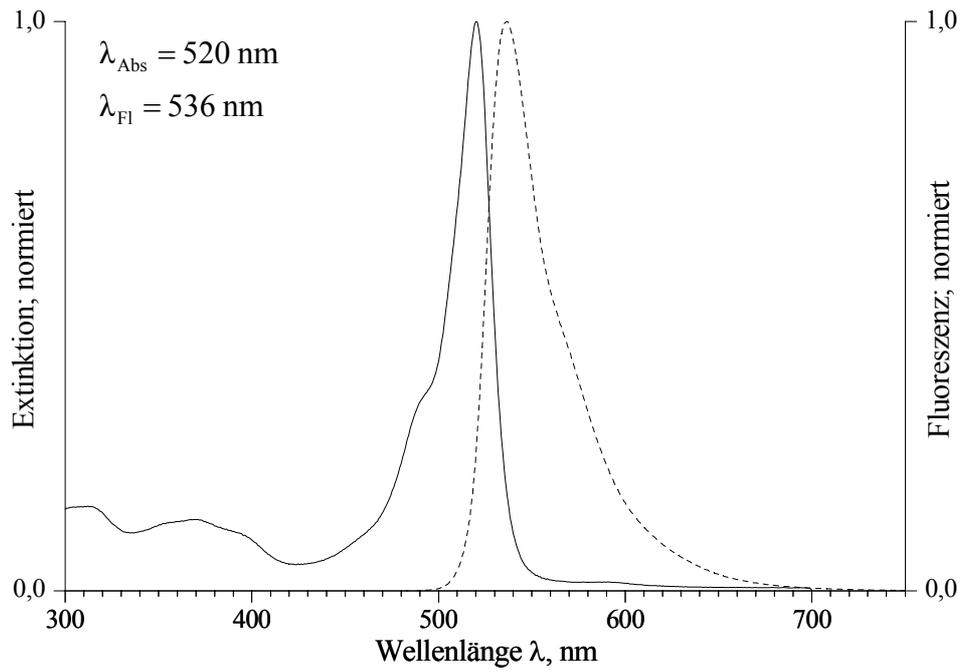


Abbildung 69: Absorptions-, Emissionsspektrum Hexylpyromethen 567 in Ethanol

8.2.6 Heptylpyrromethen 567

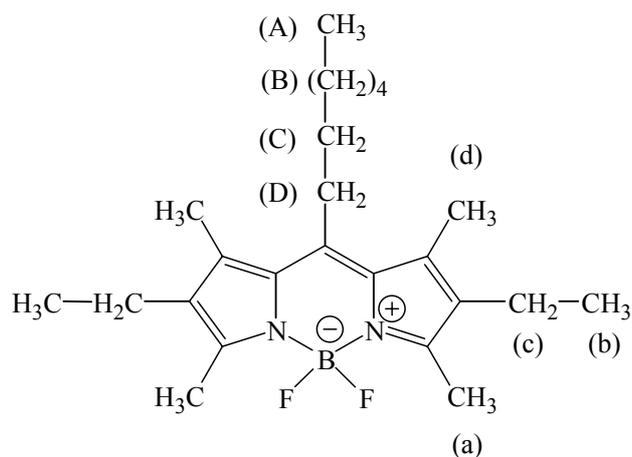


Abbildung 70: Struktur Heptylpyrromethen 567

Tabelle 19: ¹H-NMR-Daten in Deuteriochloroform von Heptylpyrromethen

| Chem. Verschiebung δ, ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 0,9 | t | 3 H | (A) |
| 1,0 | t | 6 H | (b) |
| 1,5 | m | 8 H | (B) |
| 1,6 | m | 2 H | (C) |
| 2,3 | s | 6 H | (d) |
| 2,4 | q | 4 H | (c) |
| 2,5 | s | 6 H | (a) |
| 3,0 | t | 2 H | (D) |

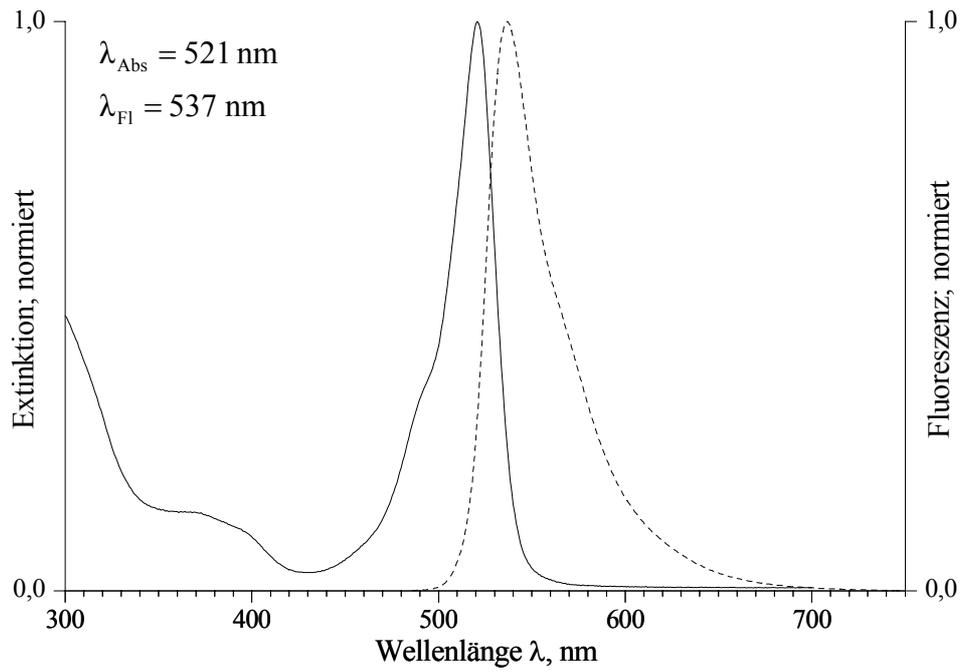


Abbildung 71: Absorptions-, Emissionsspektrum Heptylpyromethen 567 in Ethanol

8.2.7 Pyrromethen 546

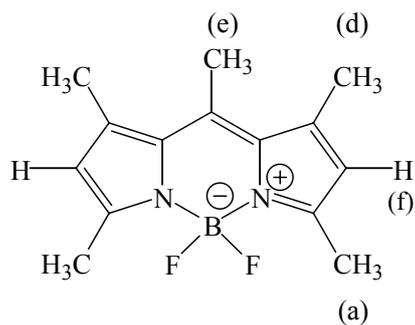


Abbildung 72: Struktur Pyrromethen 546

Tabelle 20: $^1\text{H-NMR}$ -Daten in Deuteriochloroform von Pyrromethen 546

| Chem. Verschiebung δ , ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|--------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 2,1 | s | 2 H | (f) |
| 2,3 | s | 6 H | (d) |
| 2,5 | s | 6 H | (a) |
| 2,6 | s | 3 H | (e) |

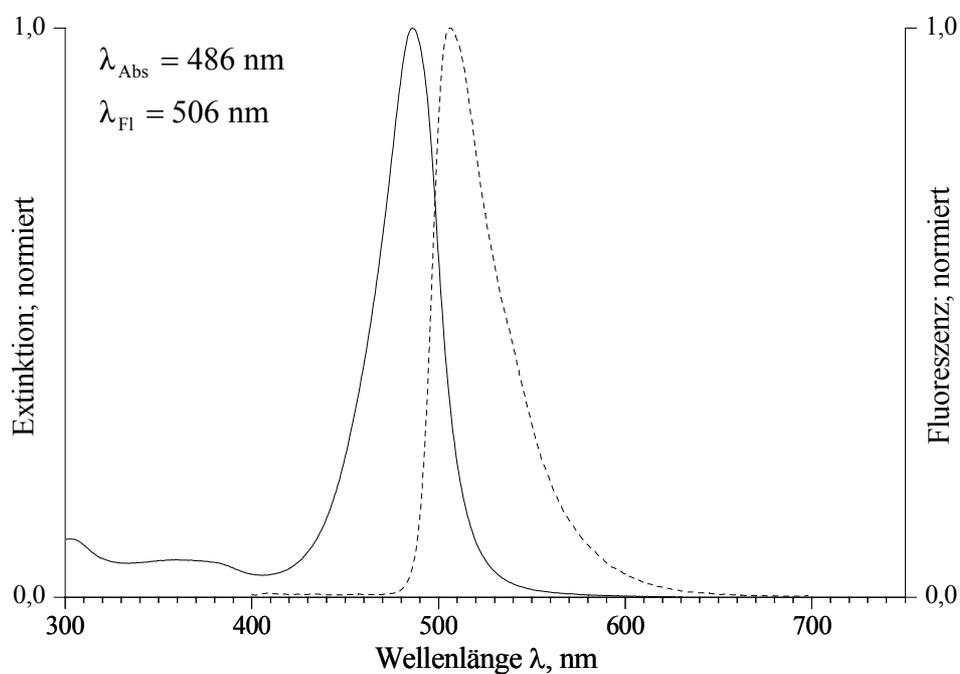


Abbildung 73: Absorptions-, Emissionsspektrum Pyrromethen 546 in Ethanol

8.2.8 Heptylpyrromethen 546

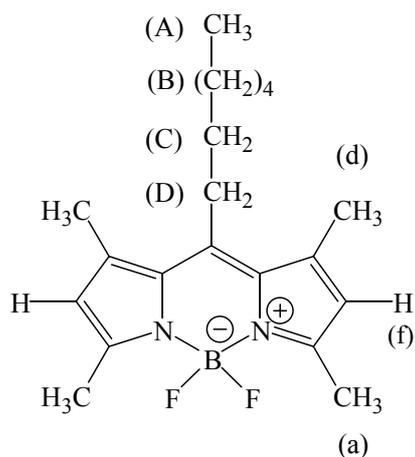


Abbildung 74: Struktur Heptylpyrromethen 546

Tabelle 21: ^1H -NMR-Daten in Deuteriochloroform von Heptylpyrromethen 546

| Chem. Verschiebung δ , ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|--------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 0,8 | t | 3 H | (A) |
| 1,4 | m | 8 H | (B) |
| 1,6 | m | 2 H | (C) |
| 2,1 | s | 2 H | (f) |
| 2,3 | s | 6 H | (d) |
| 2,4 | q | 4 H | (c) |
| 2,5 | s | 6 H | (a) |
| 3,0 | t | 2 H | (D) |

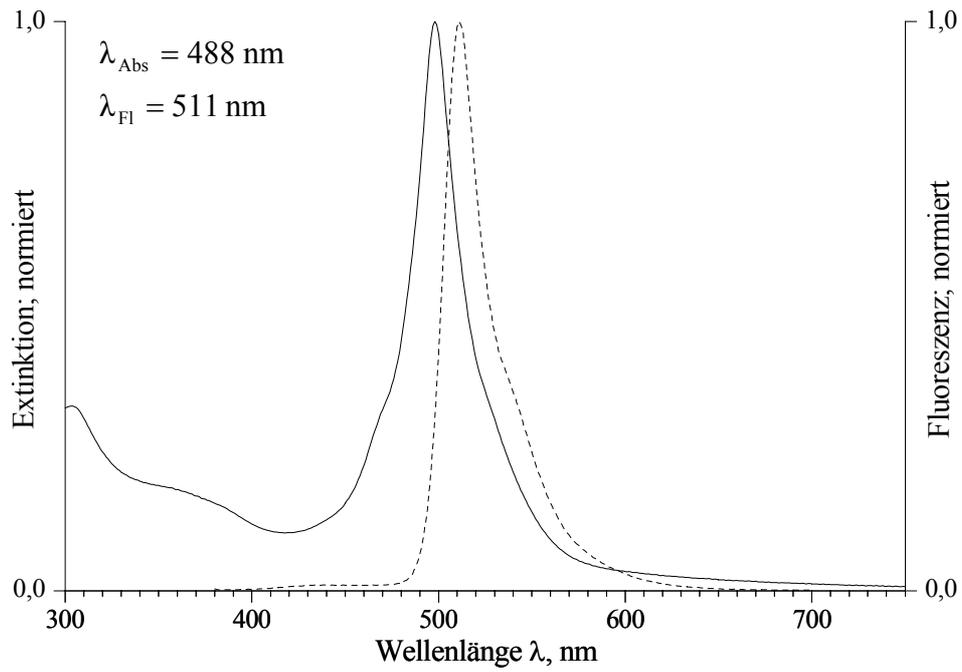


Abbildung 75: Absorptions-, Emissionsspektrum Heptylpyromethen 546 in Ethanol

8.2.9 Dipyrromethen 546

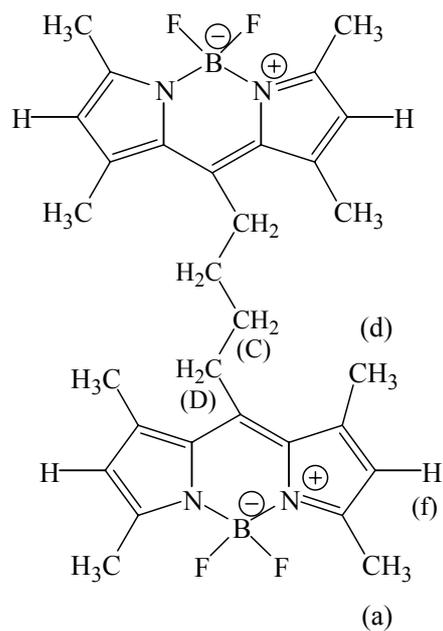


Abbildung 76: Struktur Dipyrromethen 546

Tabelle 22: ^1H -NMR-Daten in Deuteriochloroform von Dipyrromethen 546

| Chem. Verschiebung δ , ppm | Signalform | Integration | Zuordnung |
|--------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| 1,6 | m | 4 H | (C) |
| 2,1 | s | 4 H | (f) |
| 2,3 | s | 12 H | (d) |
| 2,5 | s | 12 H | (a) |
| 3,0 | t | 4 H | (D) |

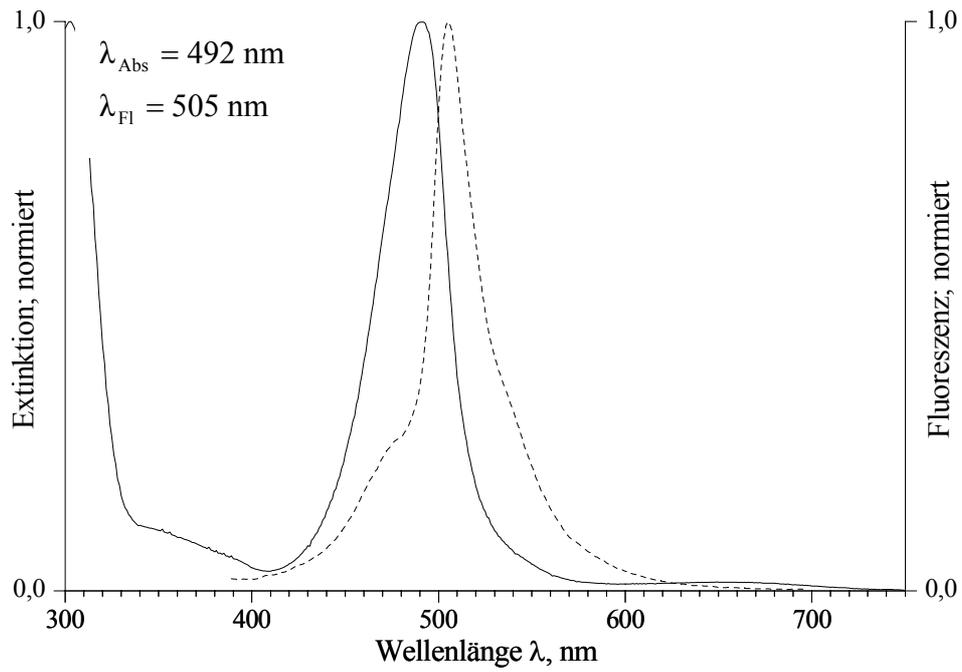


Abbildung 77: Absorptions-, Emissionsspektrum Dipyrromethen 546 in Ethanol

8.2.10 Pyrrolpyrromethen

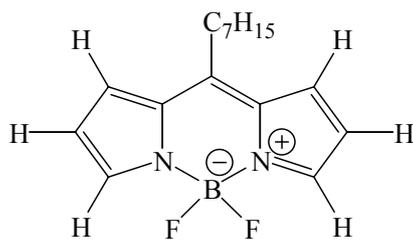


Abbildung 78: Struktur Pyrrolpyrromethen

Aufgrund der Instabilität der Verbindung sind NMR-Daten nicht verfügbar.

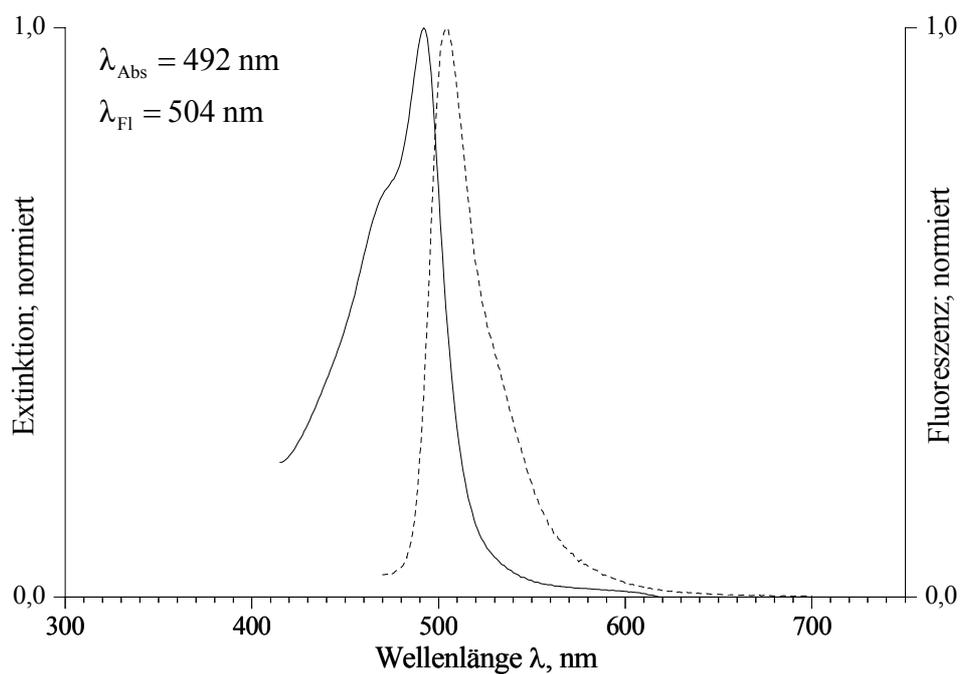


Abbildung 79: Absorptions-, Emissionsspektrum Pyrrolpyrromethen in Ethanol

8.2.11 Indolpyrromethen

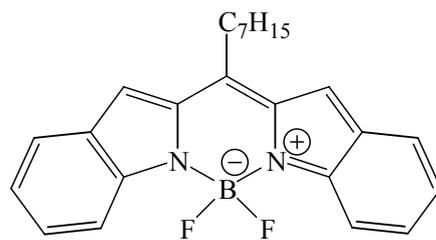


Abbildung 80: Struktur Indolpyrromethen

Aufgrund der Instabilität der Verbindung sind NMR-Daten nicht verfügbar.

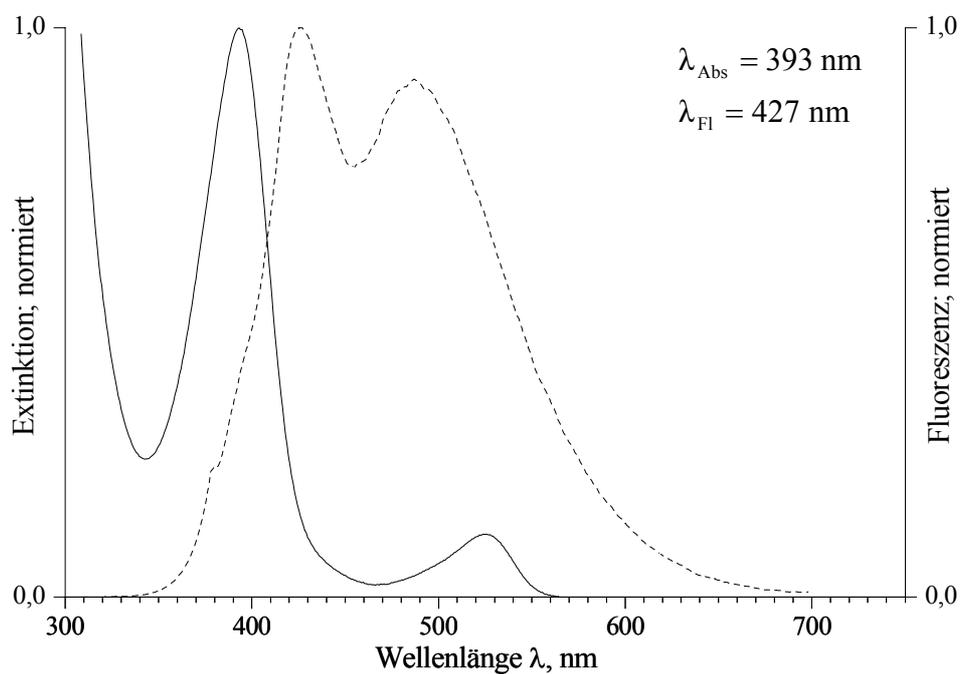


Abbildung 81: Absorptions-, Emissionsspektrum Indolpyrromethen in Ethanol

8.3 Referenzfarbstoffe zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute

8.3.1 Fluorescein

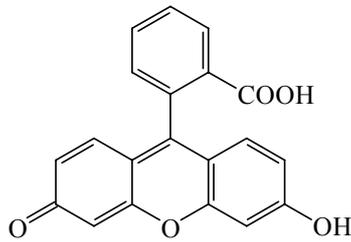


Abbildung 82: Struktur Fluorescein

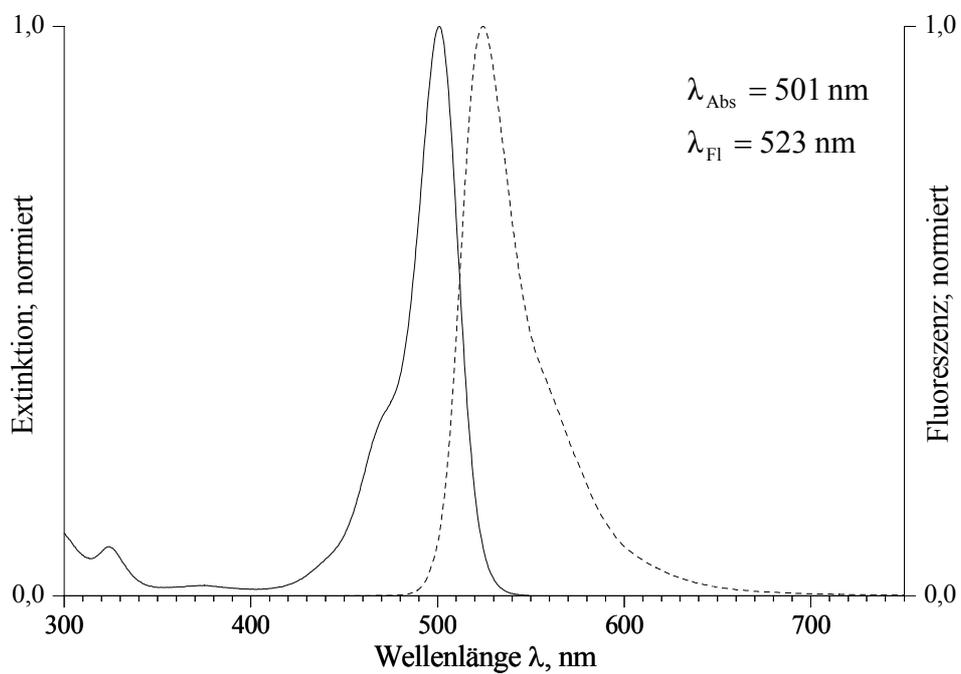


Abbildung 83: Absorptions-, Emissionsspektrum Fluorescein in Ethanol

8.3.2 Rhodamin 6G

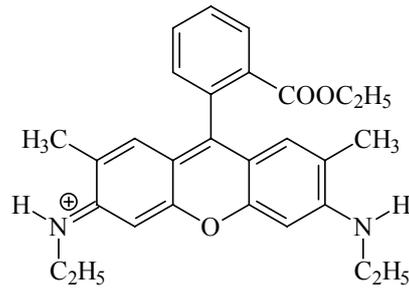


Abbildung 84: Struktur Rhodamin 6G

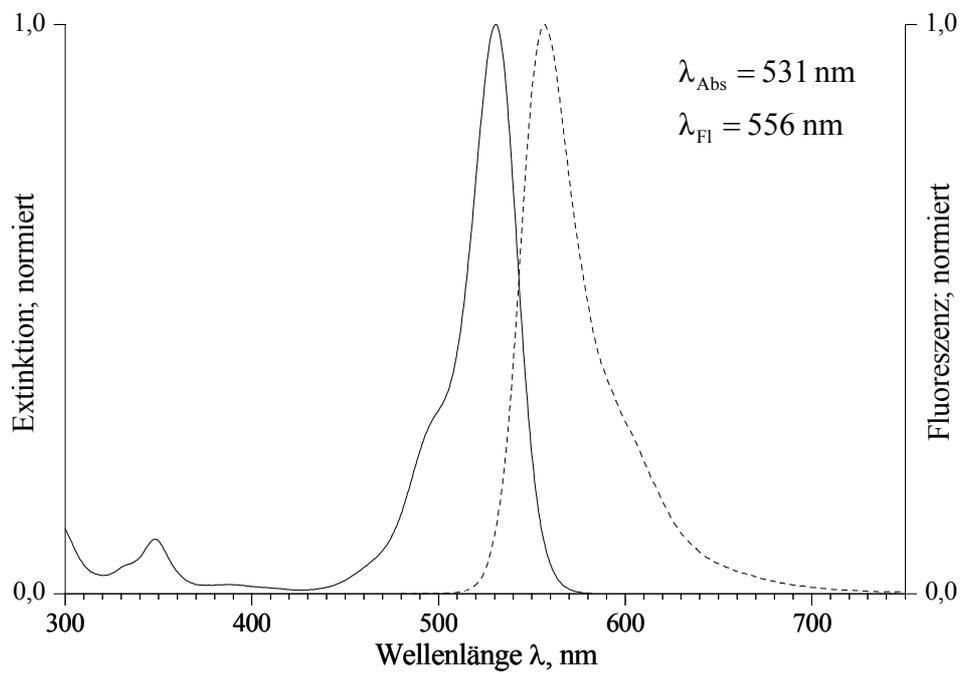


Abbildung 85: Absorptions-, Emissionsspektrum Rhodamin 6G in Ethanol

9 IUPAC-Namen

Der Vollständigkeit halber werden im Folgenden die synthetisierten Farbstoffe nach der IUPAC-Nomenklatur (**I**nternational **U**nion of **P**ure and **A**ppplied **C**hemistry) benannt. Die Bezeichnungen orientieren sich an der in Abbildung 86 dargestellten Grundstruktur der Pyrromethene und gelten für die Endprodukte.

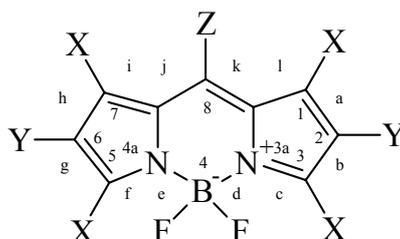


Abbildung 86: Pyrromethen-Endprodukte

Tabelle 23: IUPAC-Namen, Summenformeln, Molmassen der synthetisierten Endprodukte

| Farbstoff-Bezeichnung Summenformel | IUPAC-Name |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pyrromethen 567 C ₁₈ H ₂₅ BF ₂ N ₂ M = 318,21 g/mol | 4,4-Difluoro-2,6-diethyl-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 2,6-Diethyl-1,3,5,7,8-pentamethylpyrromethenedifluoroborate Complex |
| Butylpyrromethen 567 C ₂₁ H ₃₁ BF ₂ N ₂ M = 360,29 g/mol | 4,4-Difluoro-2,6-diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-butyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 2,6-Diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-butylpyrromethenedifluoroborate Complex |
| Pentylpyrromethen 567 C ₂₂ H ₃₃ BF ₂ N ₂ M = 374,32 g/mol | 4,4-Difluoro-2,6-diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-pentyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 2,6-Diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-pentylpyrromethenedifluoroborate Complex |
| Hexylpyrromethen 567 C ₂₃ H ₃₅ BF ₂ N ₂ M = 388,35 g/mol | 4,4-Difluoro-2,6-diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-hexyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 2,6-Diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-hexylpyrromethenedifluoroborate Complex |
| Heptylpyrromethen 567 C ₂₄ H ₃₇ BF ₂ N ₂ M = 402,37 g/mol | 4,4-Difluoro-2,6-diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-heptyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 2,6-Diethyl-1,3,5,7-tetramethyl-8-heptylpyrromethene- difluoroborate Complex |

| Farbstoff-Bezeichnung Summenformel | IUPAC-Name |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pyrromethen 546 $C_{14}H_{17}BF_2N_2$ $M = 262,10 \text{ g/mol}$ | 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 1,3,5,7,8-Pentamethylpyrromethenedifluoroborate Complex |
| Heptylpyrromethen 546 $C_{20}H_{29}BF_2N_2$ $M = 346,27 \text{ g/mol}$ | 4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-8-heptyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 1,3,5,7-Tetramethyl-8-heptylpyrromethenedifluoroborate Complex |
| Dipyrromethen 546 $C_{30}H_{36}B_2F_4N_4$ $M = 550,25 \text{ g/mol}$ | 4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-8-[4-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)-butyl]-3a,4a-diaza-s-indacene |
| Pyrrolpyrromethen $C_{16}H_{21}BF_2N_2$ $M = 290,18 \text{ g/mol}$ | 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene Pyrromethenedifluoroborate Complex |
| Indolpyrromethen $C_{24}H_{25}BF_2N_2$ $M = 390,28 \text{ g/mol}$ | 4,4-Difluoro-[b,g]-dibenzo-8-heptyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene [b,g]-Dibenzo-8-heptylpyrromethenedifluoroborate Complex |

Die Namensgebungen der Vorstufen orientieren sich an der in Abbildung 87 dargestellten chemischen Struktur.

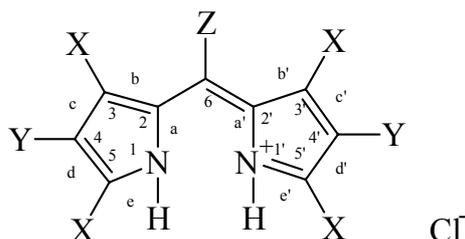


Abbildung 87: Pyrromethen-Vorstufen

Tabelle 24: IUPAC-Namen, Summenformeln, Molmassen der Pyrromethen-Vorstufen

| Vorstufe zu | IUPAC-Name | Summenformel |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Pyrromethen 567 | 4,4'-Diethyl-3,5,6,3',5'-pentamethyl-pyrromethene-hydrochlorid | C ₁₈ H ₂₇ N ₂ Cl M = 306,87 g/mol |
| Butylpyrromethen 567 | 4,4'-Diethyl-3,5,3',5'-tetramethyl-6-butylpyrromethene-hydrochlorid | C ₂₁ H ₃₃ N ₂ Cl M = 348,95 g/mol |
| Pentylpyrromethen 567 | 4,4'-Diethyl-3,5,3',5'-tetramethyl-6-pentylpyrromethene-hydrochlorid | C ₂₂ H ₃₅ N ₂ Cl M = 362,98 g/mol |
| Hexylpyrromethen 567 | 4,4'-Diethyl-3,5,3',5'-tetramethyl-6-hexylpyrromethene-hydrochlorid | C ₂₃ H ₃₇ N ₂ Cl M = 377,01 g/mol |
| Heptylpyrromethen 567 | 4,4'-Diethyl-3,5,3',5'-tetramethyl-6-heptylpyrromethene-hydrochlorid | C ₂₄ H ₃₉ N ₂ Cl M = 391,04 g/mol |
| Pyrromethen 546 | 3,5,6,3',5'-Pentamethyl-pyrromethene-hydrochlorid | C ₁₄ H ₁₉ N ₂ Cl M = 250,77 g/mol |
| Heptylpyrromethen 546 | 3,5,3',5'-Tetramethyl-6-heptyl-pyrromethene-hydrochlorid | C ₂₀ H ₃₁ N ₂ Cl M = 334,93 g/mol |
| Dipyrromethen 546 | 3,5,3',5'-Tetramethyl-6-[4-(3,5,3',5'-tetramethyl-pyrromethene-6-yl)-butyl]-pyrromethene-dihydrodichlorid | C ₃₀ H ₄₀ N ₄ Cl ₂ M = 527,57 g/mol |
| Pyrrolpyrromethen | Pyrromethene-hydrochlorid | C ₁₆ H ₂₃ N ₂ Cl M = 278,82 g/mol |
| Indolpyrromethen | [d,d']-Dibenzo-6-heptylpyrromethene-hydrochlorid | C ₂₄ H ₂₇ N ₂ Cl M = 378,94 g/mol |

10 VbF – Verordnung über brennbare Flüssigkeiten

Auszug aus „VbF - Verordnung über brennbare Flüssigkeiten“, Fassung vom 13. Dezember 1996, (BGBl. I S 1938, ber. 1997 S. 447)

Brennbare Flüssigkeiten im Sinne dieser Verordnung sind Stoffe mit Flammpunkt, die bei 35 °C weder fest noch salbenförmig sind, bei 50 °C einen Dampfdruck von 3 bar oder weniger haben und zu einer der nachstehenden Gefahrenklassen gehören:

1. Gefahrklasse A:

Flüssigkeiten, die einen Flammpunkt nicht über 100 °C haben und hinsichtlich der Wasserlöslichkeit nicht die Eigenschaften der Gefahrklasse B aufweisen, und zwar Gefahrklasse A I:

Flüssigkeiten mit einem Flammpunkt unter 21 °C,

Gefahrklasse A II:

Flüssigkeiten mit einem Flammpunkt von 21 °C bis 55 °C,

Gefahrklasse A III:

Flüssigkeiten mit einem Flammpunkt über 55 °C bis 100 °C;

2. Gefahrklasse B:

Flüssigkeiten mit einem Flammpunkt unter 21 °C, die sich bei 15 °C in Wasser lösen oder deren brennbare flüssige Bestandteile sich bei 15 °C in Wasser lösen.

Brennbare Flüssigkeiten der Gefahrklasse A III, die auf ihren Flammpunkt oder darüber erwärmt sind, stehen den brennbaren Flüssigkeiten der Gefahrklasse A I gleich.