

# *(Leseversion)*

Innovationsforum Bitterfeld-Wolfen  
31. Mai – 1. Juni 2012



---

## Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen: Potential und Grenzen

Karl H. Drexhage

---

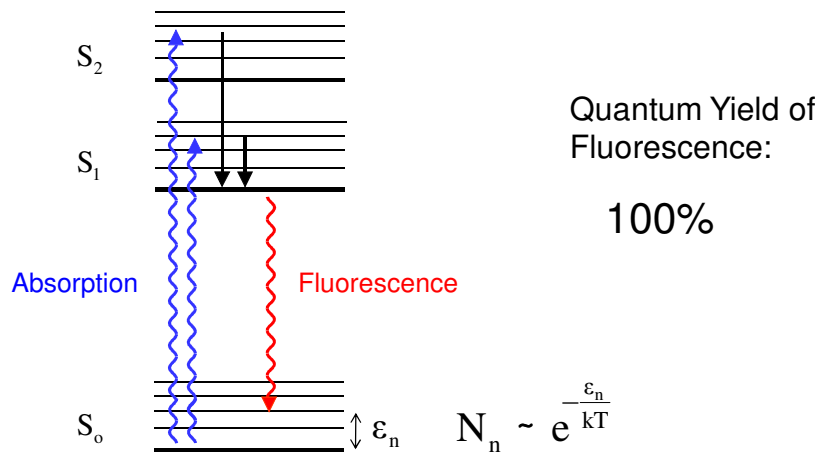
ATTO-TEC GmbH 

Die wichtigsten elektronischen Zustände eines organischen Farbstoffmoleküls sind die Singulett-Zustände  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ .... Durch Absorption eines Photons geht das Molekül in einen angeregten Zustand über. Wenn dabei ein höher-energetischer Zustand, z.B.  $S_2$ , erreicht wurde, findet eine sehr schnelle (psec) strahlungslose Desaktivierung zum Zustand  $S_1$  statt. Von hier kann das Molekül unter Emission eines Photons (Fluoreszenz) in den Grundzustand  $S_0$  zurückkehren. Falls kein anderer Desaktivierungs-Prozeß möglich ist, würden alle angeregten Moleküle in dieser Weise desaktiviert – und die Fluoreszenz-Quantenausbeute aller Farbstoffe wäre 100 %! (Bild 2)

## Radiative Transitions: Absorption, Fluorescence



2



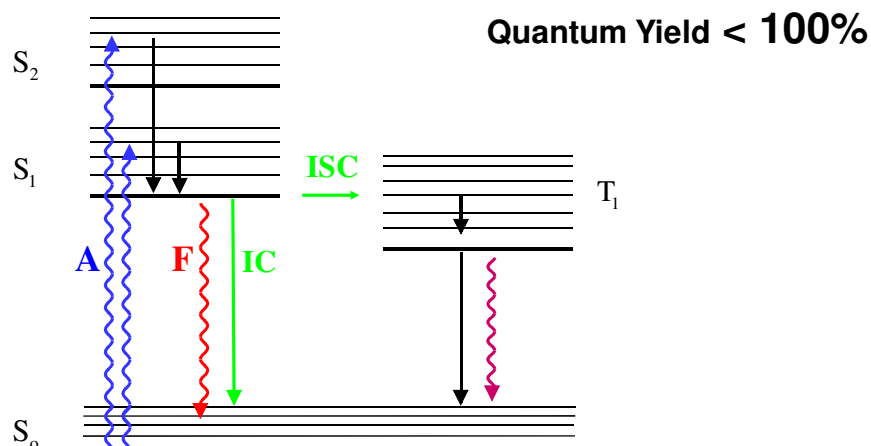
ATTO-TEC GmbH 

Tatsächlich gibt es aber viele Prozesse der Desaktivierung, bei denen die Anregungsenergie nicht in Form eines Photons abgegeben wird, sondern in Wärme verwandelt wird. Diese Prozesse konkurrieren mit der Abstrahlung, was dazu führt, daß die Quantenausbeute aller realen Farbstoffe kleiner als 100 % ist (Bild 3).

## Non-radiative Deactivation of $S_1$ Competes with Fluorescence



3



ATTO-TEC GmbH 

Die strahlungslose Desaktivierung direkt zum Grundzustand bezeichnet man als Internal Conversion (IC), die Desaktivierung auf dem Umweg über Triplett-Zustände wird Intersystem Crossing genannt (ISC). Zur Vereinfachung fassen wir diese Prozesse zusammen. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute  $\eta_F$  ist dann durch die Geschwindigkeitskonstante (Rate) der Emission  $k_F$  relativ zu den Raten  $k_C$  und  $k_{ISC}$  der konkurrierenden strahlungslosen Prozesse bestimmt (Bild 4).

## Fluorescence Quantum Yield



4

$$\eta_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}$$

Rates of non-radiative processes determine quantum yield  $\eta_F$ !

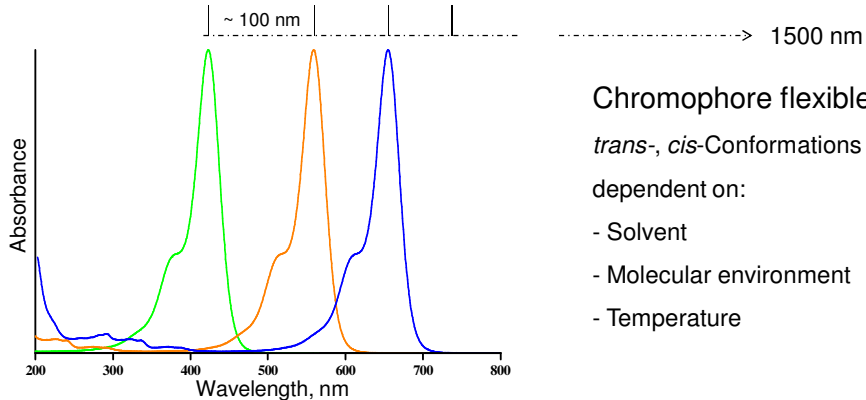
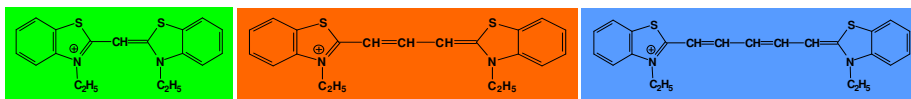
ATTO-TEC GmbH 

Die Grundstruktur organischer Farbstoffe findet sich in den bekannten *Cyanin*-Farbstoffen. Die Lichtabsorption - und damit die Farbe - wird hervorgerufen durch ein symmetrisches lineares System von konjugierten Doppelbindungen (Bild 5).

## Cyanine Dyes



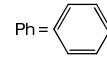
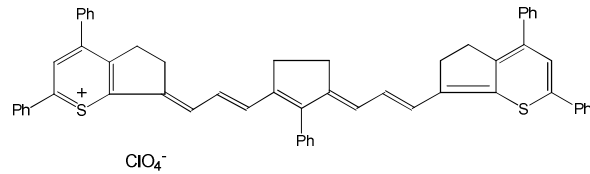
5



ATTO-TEC GmbH 

Bei Verlängerung des  $\pi$ -Elektronen-Systems um ein Doppel-Einfachbindungs-Paar verschiebt sich das Absorptionsmaximum um ca. 100 nm zu längeren Wellen (bathochrom). Dieses Verhalten lässt sich mit einfachen quantenmechanischen Näherungsverfahren (Elektronengas-Modell) gut verstehen und wurde in bestimmten Fällen bis ca. 1500 nm experimentell nachgewiesen (Bild 5A).

## IR-Cyanine



LM:  $o\text{-C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$

$$\lambda_A = 1500 \text{ nm}$$

K.H. Drexhage, M. Kussler, B. Sens, N.-J. Marx, DE 33 16666 A1 (1983)  
Benno Sens *Ph.D.Thesis* Siegen (1984)

ATTO-TEC GmbH 

Die Struktur der einfachen Cyanine erlaubt die Ausbildung einer Vielzahl verschiedener cis,trans-Konformationen, deren optische Eigenschaften sich drastisch unterscheiden können. In Lösung stellt sich meist ein Gleichgewicht von cis,trans-Isomeren ein, dessen Lage von Umgebungseinflüssen geprägt ist. Daher ist insbesondere die Fluoreszenz-Quantenausbeute sehr stark von Lösungsmittel, Temperatur etc. abhängig.

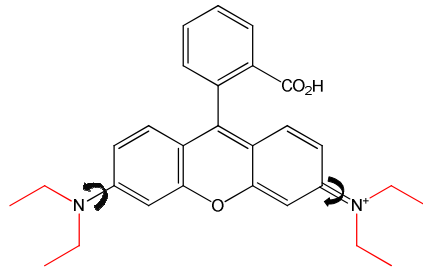
Eine – auch nur halbwegs brauchbare – quantenmechanische Voraussage der Größen  $k_{IC}$  und  $k_{ISC}$  und damit der Fluoreszenz-Quantenausbeute von Farbstoffen ist bisher nicht gelungen. Es gibt jedoch einige empirisch gefundene Zusammenhänge mit der Molekülstruktur. Daraus abgeleitete Konzepte erlauben es, neue Fluoreszenzmarker gezielt zu synthetisieren:

Durch Einbau des chromophoren  $\pi$ -Elektronen-Systems in ein starres Molekülgerüst wird die Flexibilität aufgehoben: Der Farbstoff existiert nur noch in einer einzigen Konformation (Bild 6), da die – prinzipiell bewegliche – *o*-carboxy-phenyl-Gruppe der Rhodamine orthogonal zum chromophoren System sterisch fixiert ist. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute von *Rhodamin 101* beträgt nahezu 100 %, weitgehend unabhängig von Umgebungseinflüssen. Die hohe Quantenausbeute dieses Farbstoffs ist aber nicht allein durch die Starrheit des Chromophors bedingt, sondern auch durch seine Planarität.

## Fully Rigid Chromophore: $\eta_F$ very high

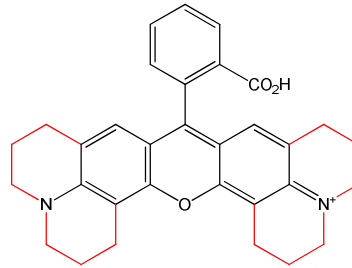


6



Rhodamine B

$\eta_F$  (20°C) **55 %**



Rhodamine 101

**96 %**

independent of temperature

G.A. Reynolds, K.H. Drexhage 1973

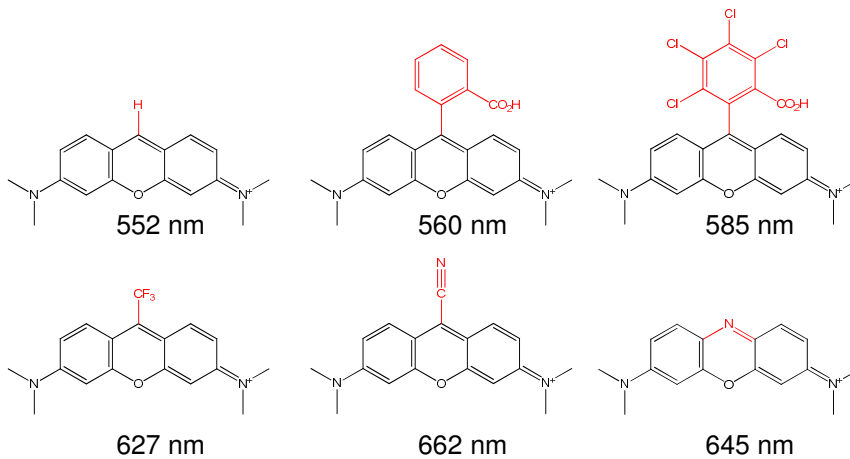
ATTO-TEC GmbH 

Durch die Art des Substituenten am zentralen C-Atom des Rhodamin-Gerüsts lässt sich die Lage der Absorptionsbande und damit auch die Fluoreszenz über einen Bereich von etwa 100 nm variieren (Bild 7).

## Bathochromic Shift by Substitution



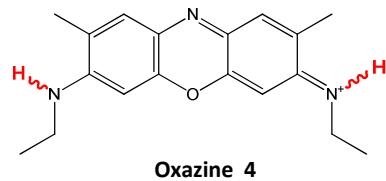
7



J. Arden-Jacob, K.H. Drexhage 1992

ATTO-TEC GmbH 

Für die strahlungslose Desaktivierung des angeregten Zustandes  $S_1$  sind nicht nur Flexibilität und mangelnde Planarität des Chromophors verantwortlich. Ein wichtiger, gänzlich anderer Prozess lässt sich an dem in Bild 8 gezeigten Beispiel veranschaulichen:



Ethanol:

$$\lambda_A = 614 \text{ nm}$$

$$\lambda_F = 651 \text{ nm}$$

	$\eta_F$
$\text{N}\text{---}\text{H}$	62 %
$\text{N}\text{---}\text{D}$	87 %

K.H. Drexhage 1973

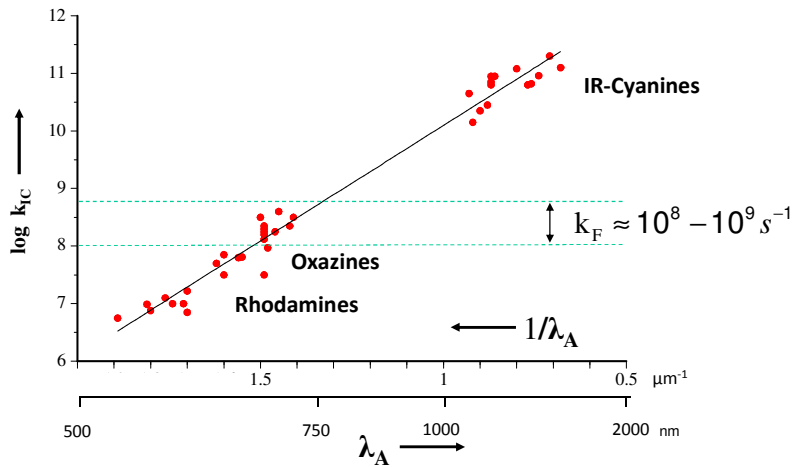
**ATTO-TEC GmbH**

Löst man den Farbstoff Oxazin 4 in (mono)deutertem Ethanol, so steigt die Fluoreszenz-Quantenausbeute auf 87 % im Vergleich zu 62 % in normalem Ethanol, während Absorptions- und Fluoreszenz-Spektren unverändert bleiben. Offenbar werden die H-Atome der Amino-Gruppen gegen Deuterium ausgetauscht, wodurch sich die Rate der strahlungslosen Desaktivierung von  $S_1$  deutlich verringert: Elektronische Anregungsenergie wird in N-H Schwingungsenergie umgewandelt, und zwar effizienter als bei N-D Schwingungen. Dieser Prozeß der inneren Konversion in N-H, C-H und auch in C-C Schwingungen ist umso effizienter, je geringer die Energiedifferenz zwischen  $S_1$  und  $S_0$  ist. Experimentell ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen  $\log k_{IC}$  und  $1/\lambda_A$ , d.h. zwischen  $\log k_{IC}$  und der Anregungsenergie (Bild 10). Da die Rate  $k_F$  der Emission sich nur wenig mit der Anregungsenergie ändert, bedeutet das, daß die Fluoreszenz-Quantenausbeute eines Farbstoffs umso kleiner sein muß, je weiter im Roten bzw. Infraroten die Fluoreszenzbande liegt. Diese Abnahme mit der Emissions-Wellenlänge ist nahezu exponentiell – sehr unglücklich für die Anwendung als Fluoreszenzmarker. Andererseits folgt aber auch aus Bild 10, daß die Quantenausbeute mit der Emissionswellenlänge zwar immer kleiner, aber nicht identisch-null wird. Mit einem Cyanin, dessen Quantenausbeute nur 0,01 % beträgt, konnten Farbstofflaser-Pulse von 12,5 psec Dauer bei 1800 nm erzeugt werden (H. J. Polland et al. *Appl. Phys.* **B 32**, 53-57 (1983).

## Energy Transfer into C-H and C-C Vibrations: Internal Conversion



10



R. Sens, K.H. Drexhage 1984

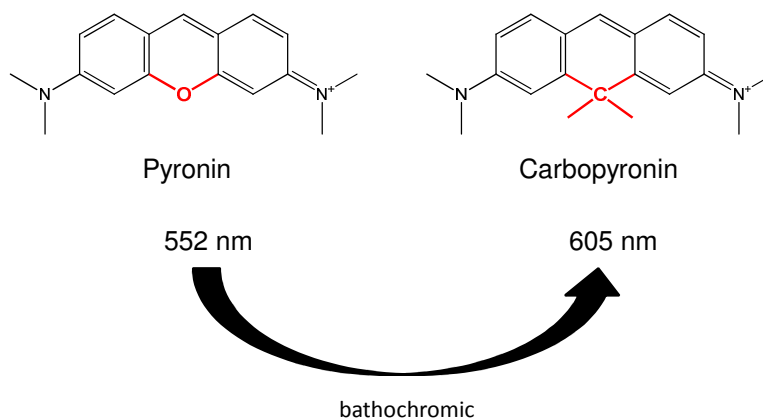
ATTO-TEC GmbH 

Ersatz der O-Brücke in Xanthen-Farbstoffen (Rhodaminen) durch ein tetraedrisches C-Atom führt zu einer langwelligeren Verschiebung von etwa 50 nm (Bild 11), und man erhält eine ganze Klasse neuer wertvoller Fluoreszenz-Farbstoffe analog den Xanthenen (Bild 7).

## Rigidization by Carbon Bridge



11



C. Aaron, C. C. Barker 1963

K.H. Drexhage, J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos, A. Zilles WO 00/64986 (1999)

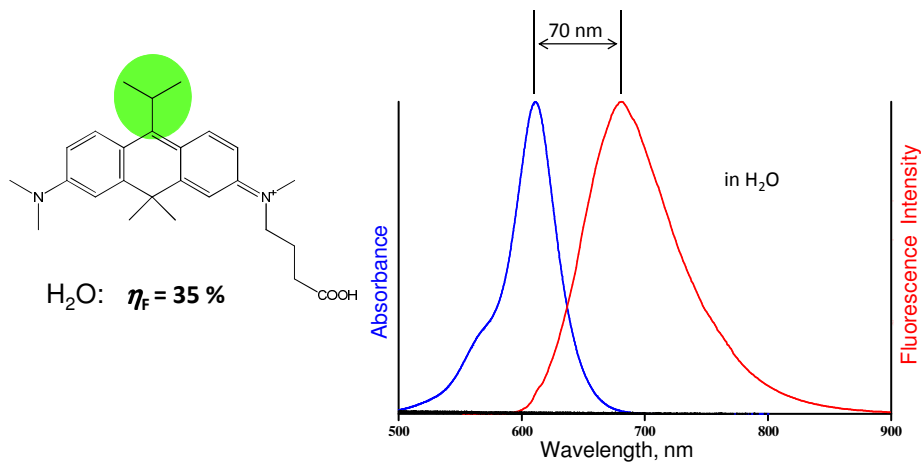
ATTO-TEC 

Ein interessantes Phänomen zeigen Carbopyronine, die einen iso-propyl Substituenten im Zentrum des chromophoren Systems tragen: Sie zeigen eine ungewöhnlich große Stokes-Verschiebung von 70 nm, und die Fluoreszenz-Quantenausbeute ist mit 35 % bei Emission um 700 nm überraschend hoch – und das in **wäßriger** Lösung! (Bild 12)

**Strain Relaxation in Excited State:  
Large Stokes-Shift,  $\eta_F$  high**



12



ATTO-TEC GmbH 

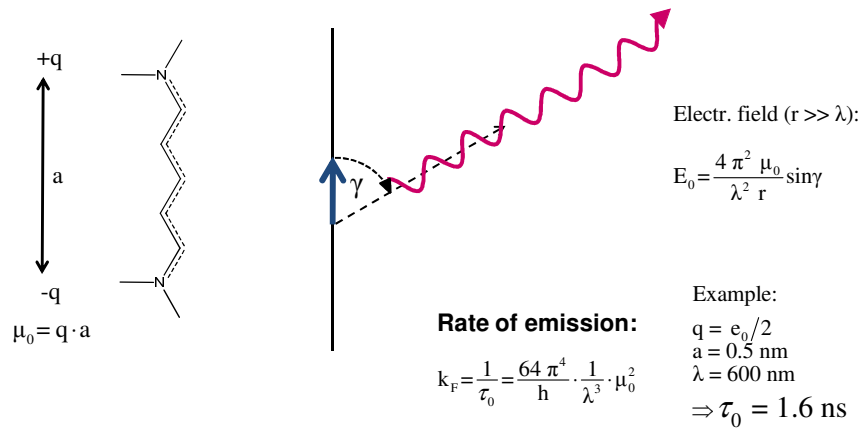
Um den eigentlichen Prozeß der Lichtemission eines Moleküls (Fluoreszenz) besser zu verstehen, kann man das elektronisch angeregte Molekül – unabhängig von seiner chemischen Beschaffenheit – als eine Dipol-Antenne, die elektromagnetische Wellen (Licht) aussendet, betrachten (Hertz'scher Dipol). Für Entfernungen  $r$  groß gegen Wellenlänge  $\lambda$  lassen sich dann die Eigenschaften des Wellenfeldes, d.h. der Fluoreszenz, leicht angeben (Bild 14). Mit vernünftigen Annahmen über Ladung und Länge des Dipols ergibt sich eine Fluoreszenz-Abklingzeit im Bereich von 1 ns, in guter Übereinstimmung mit experimentell an Farbstoffen gefundenen Werten.



## Emission by Dipole Antenna (Hertzian Dipole)



14



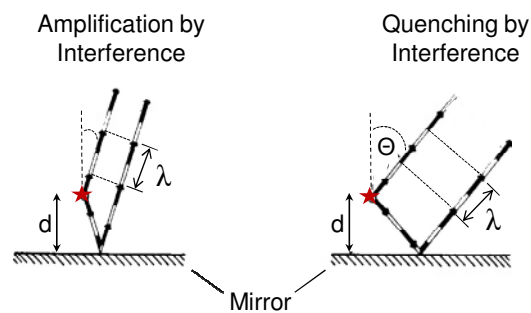
ATTO-TEC GmbH 

Die in Bild 14 gegebene Beschreibung gilt für Abstrahlung in den freien Raum (Vakuum). Wird das Wellenfeld jedoch durch reflektierende Flächen (Spiegel) gestört, so interferieren direkt abgestrahlte und am Spiegel reflektierte Welle (Bild 15). Als Folge davon ergibt sich ein Richtdiagramm der Fluoreszenz, das völlig anders aussieht als bei Abwesenheit des Spiegels. (Bild 16)

## Electric Dipole Radiation Interacting with Plane Mirror



15

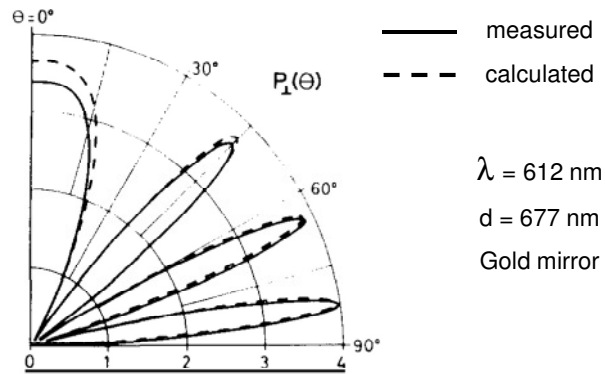


ATTO-TEC GmbH 

## Angular Distribution of Europium Ion Fluorescence



16



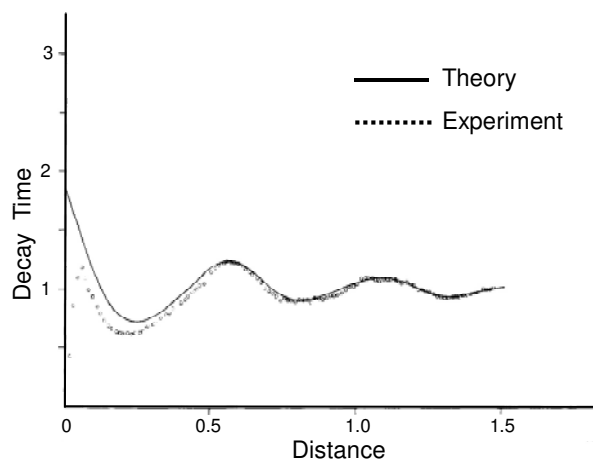
ATTO-TEC GmbH 

Der Einfluß eines benachbarten Reflektors äußert sich nicht nur im Richtungsdiagramm, sondern auch in der Rate der Abstrahlung: Die Fluoreszenz-Abklingzeit hängt von der Entfernung des emittierenden Moleküls vom Spiegel ab.

## Decay Time of $\text{Eu}^{3+}$ in Front of Silver Mirror



17



K.H. Drexhage *Progress in Optics XII*, 163 (1974)

ATTO-TEC GmbH 

Dieser zunächst vielleicht überraschende Effekt läßt sich mit Hilfe eines Gedankenexperimentes gut verstehen (Bild 19):


 Radius  $1.75 \lambda$ 

Constructive Interference:

Dipole radiates twice the power as without the mirror.

$$\tau_M = \frac{1}{2} \tau_0$$


 Radius  $2 \lambda$ 

Destructive Interference:

Dipole cannot radiate.

$$\tau_M = \infty$$

K.H. Drexhage *J. Luminesc.* **1,2**, 693 (1970)

ATTO-TEC GmbH 

Hier wie auch im Fall des ebenen Spiegels (Bild 17) handelt es sich um die Wechselwirkung eines jeweils einzelnen emittierenden Moleküls mit dem Reflektor, also nicht um einen kooperativen Effekt vieler Moleküle. Natürlich emittiert jedes angeregte Molekül nur ein Photon. Erst viele solcher Emissionsprozesse neben- und/oder nacheinander ergeben die gemessene Richtcharakteristik und Lebensdauer. Es sei auch erwähnt, daß die mit der Emission (Fluoreszenz) konkurrierende strahlungslose Desaktivierung eines angeregten Moleküls nicht durch reflektierende Flächen beeinflusst wird: Der Spiegel wirkt nur ein auf die strahlende Desaktivierung. Deshalb ist dessen Einfluß auf die tatsächlich gemessene Fluoreszenz-Abklingzeit (reale Lebensdauer) abhängig von der Fluoreszenz-Quantenausbeute  $\eta_F$  des Farbstoffs und ist am stärksten bei  $\eta_F = 100 \%$ .

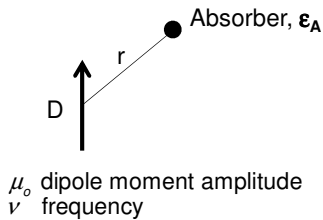
Die hier beschriebenen Effekte müssen beachtet werden bei fluoreszierenden Molekülen, die sich innerhalb von Nanostrukturen befinden – auch ohne Anwesenheit von Metallspiegeln. Denn die Grenzfläche zwischen Medien von verschiedenem Brechungsindex kann bereits einen wirksamen „Spiegel“ in obigem Sinne darstellen.

Ein oszillierender Dipol (angeregtes Molekül) umgibt sich auch bei kleinen Abständen ( $r \ll \lambda$ ) mit einem elektrischen Feld, das mit einem anderen Oszillator gleicher Frequenz wechselwirken kann. Das führt bei zwei Farbstoffmolekülen zu der von Förster quantitativ vorhergesagten Energieübertragung zwischen Donor und Akzeptor (FRET). Von H. Kuhn wurde gezeigt, daß dieses Phänomen auch als Absorption im Nahfeld eines Hertz'schen Dipols verstanden werden kann (Bild 20). Hier wie im Folgenden sei strahlungslose Desaktivierung des Donors vernachlässigt ( $\eta_F = 100 \%$ ).

## Oscillating Electric Dipole Near Field



20



$$\text{Electric Field } (r \ll \lambda): E_o = \frac{\kappa \mu_o}{n^2 r^3}$$

$$\text{Power absorbed by A: } P_{DA} \sim E_o^2 \cdot \epsilon_A$$

$$\text{Power loss of D by radiation: } P_{rad} \sim \mu_o^2 \cdot \nu^4$$

Rate of energy transfer D → A:

$$n_{DA} = \frac{9 \ln 10 \kappa^2}{128 \pi^5 N n^4 \tau_D} \cdot \frac{1}{r^6} \cdot \frac{\epsilon_A}{\nu^4}$$

FRET =  
Absorption in Near-Field  
of Donor

agrees with Förster-formula for Donor of  
single frequency  $\nu$

H. Kuhn 1967

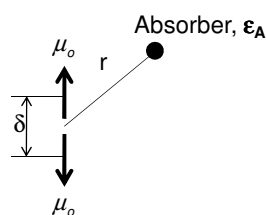
ATTO-TEC GmbH 

Die Fluoreszenz von Farbstoffen etc. basiert in den weitaus meisten Fällen auf elektrischen Dipol Übergängen. Es gibt aber auch Fälle, etwa bei Übergangselementen, in denen ein höherer Multipol, z.B. ein oszillierender magnetischer Dipol als Ursache der Lumineszenz nachgewiesen wurde. Denkbar ist auch ein elektrischer Quadrupol als Emitter. Befindet sich in dessen Nahfeld ein Absorber (Extinktionskoeffizient  $\epsilon_A$ ), so läßt sich dessen Absorption und damit die Rate der Energieübertragung analog dem Fall des elektrischen Dipol-Emitters leicht angeben (Bild 21).

## Electric-Quadrupole Donor



21



$$\text{Electric Field } (r \ll \lambda): E_o = \frac{\kappa_Q \delta \mu_o}{n^2 r^4}$$

Rate of energy transfer Q → A:

$$n_{QA} = \frac{45 \ln 10 \kappa_Q^2}{512 \pi^7 N n^6 \tau_Q} \cdot \frac{1}{r^8} \cdot \frac{\epsilon_A}{\nu^6}$$

H. Kuhn *J. Chem. Phys.* **53**, 101 (1970)  
K. H. Drexhage 5<sup>th</sup> Intern. Conf. Photochem. Yorktown Heights, N.Y., Sept. 2-5, 1969

ATTO-TEC GmbH 

Auch der „Kritische Abstand“ für Energieübertragung läßt sich analog berechnen (Bild 22).

## Critical Distance of Energy Transfer



22

El. Dipole 
$$R_D^6 = \frac{9 \ln 10 \kappa^2}{128 \pi^5 N n^4} \cdot \frac{\epsilon_A}{\tilde{\nu}^4}$$

El. Quadrupole 
$$R_Q^8 = \frac{45 \ln 10 \kappa_Q^2}{512 \pi^7 N n^6} \cdot \frac{\epsilon_A}{\tilde{\nu}^6}$$

K. H. Drexhage FRET Meeting Göttingen, March 27-30, 2011

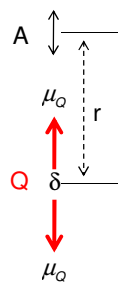
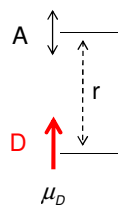


Sowohl Rate der Emission als auch Rate der Energieübertragung nehmen schneller mit der Entfernung vom Donor ab als im Fall des el. Dipols. Da aber die Rate der Energieübertragung weniger stark abnimmt als die Rate der Emission, ergibt sich für den Quadrupol-Donor ein größerer *Kritischer Abstand* als für einen vergleichbaren Dipol-Donor. (Bild 23 und 25).

### Example: El. Dipole vs. Quadrupole



23



$$\mu_Q = \mu_D$$

$$\delta = 0.1 \text{ nm}$$

$$\lambda = 500 \text{ nm}$$

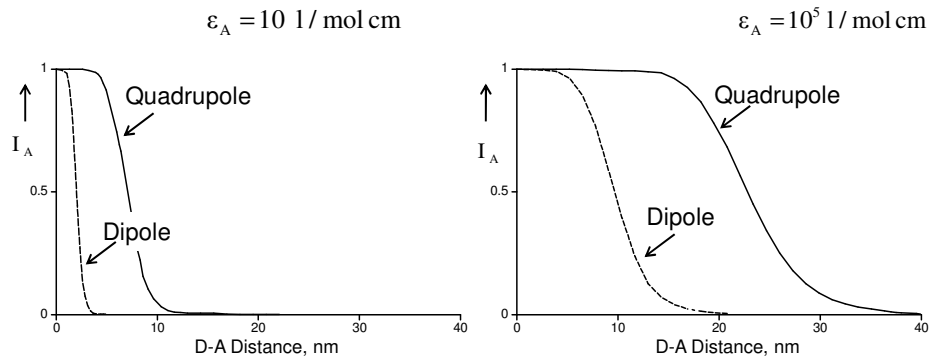
$$n = 1.5$$



## Energy Transfer: Efficiency vs. Distance



25



ATTO-TEC GmbH 

Es sei erwähnt, daß laterale elektrische Quadrupole (Bild 26) sowie magnetische Dipole als Donor – Oszillatoren zu qualitativ gleichen Ergebnissen führen wie die obige Betrachtung eines axialen elektrischen Quadrupols.

## Quadrupole Types



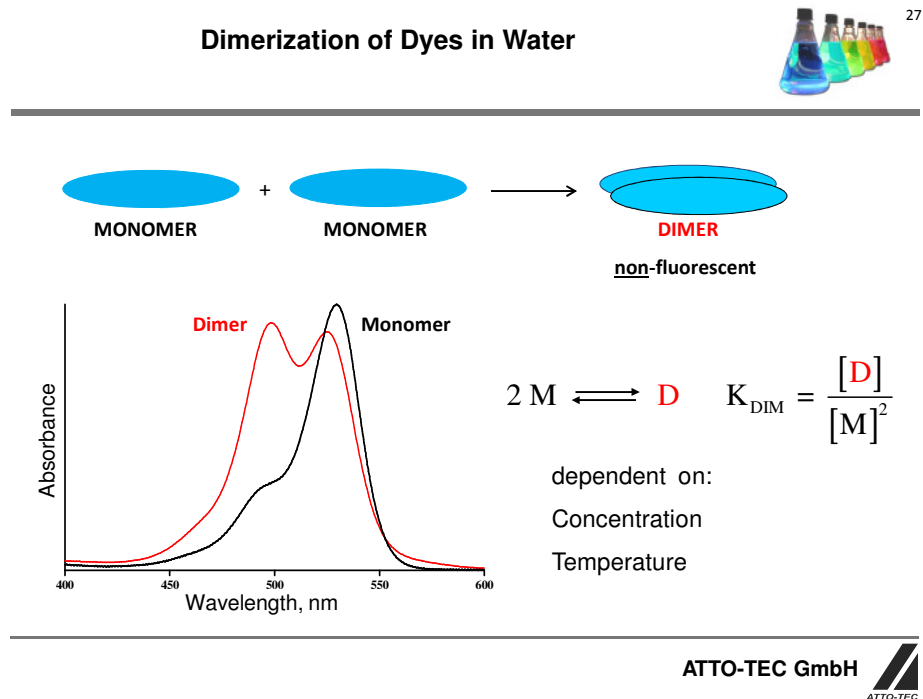
26



ATTO-TEC GmbH 

Fluoreszenz, die von einem el. Quadrupol Übergang ausgeht, wurde bisher offenbar noch nicht nachgewiesen. Die hier beschriebene Art der Energieübertragung kann aber experimentelle Ergebnisse erklären, die nicht mit der Förster'schen Formel (el. Dipol Donor) in Einklang zu bringen sind – etwa, wenn die gefundene Energieübertragung effizienter und weitreichender ist als erwartet.

Quadrupol-Übergänge sind auch zu erwarten in Farbstoff-Dimeren, die sich häufig bei hohen Konzentrationen in wässriger Lösung bilden und sich durch ein eigenes Absorptionsspektrum zu erkennen geben (Bild 27).

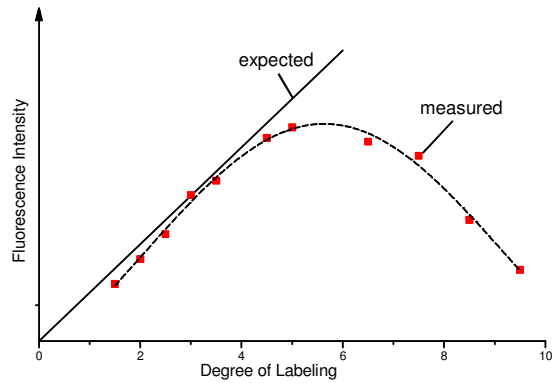
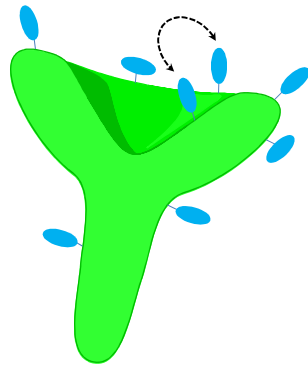


Selbst im Fall hoher Fluoreszenz-Quantenausbeute der Monomeren fluoreszieren die im Gleichgewicht vorhandenen Dimeren nur sehr schlecht oder gar nicht. Wird ein solcher Farbstoff als Marker an ein Protein gekoppelt, welches mehr als eine kopplungsfähige Gruppe enthält, so entsteht ein Gemisch von Konjugat-Molekülen mit einem mittleren Markierungsgrad, der gewöhnlich mit „DOL“ (Degree of Labeling) bezeichnet wird. Durch Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen, die sich am selben Protein-Molekül befinden, verringert sich – ähnlich wie bei wässrigen Lösungen des Farbstoffs - die Fluoreszenz-Quantenausbeute. Deshalb steigt die erreichbare Fluoreszenz-Intensität mit steigendem DOL zwar zunächst wie erwartet an, fällt aber bei hohem DOL wieder ab (Bild 28).

## Dye Conjugates: Fluorescence Quenching



28



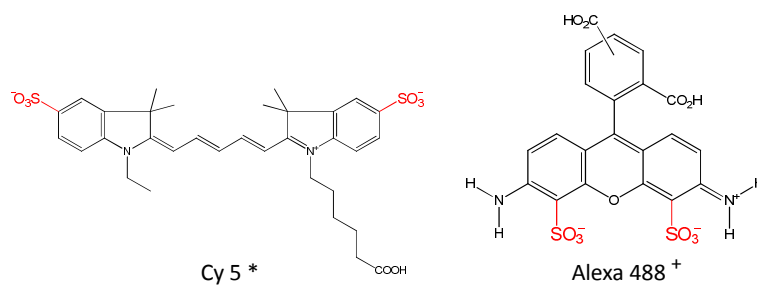
ATTO-TEC GmbH 

Die Bildung nicht-fluoreszierender Dimerer sowie die unerwünschte Fluoreszenzlöschung in Protein-Konjugaten läßt sich zurückdrängen durch Substitution des Marker-Farbstoffs mit Sulfonsäure-Gruppen (-SO<sub>3</sub>H), aber in den meisten Fällen doch nicht vollständig verhindern. (Bild 29)

## Suppression of Aggregation by -SO<sub>3</sub>H



29



\* A. S. Waggoner et al. 1989  
+ Molecular Probes 1997

ATTO-TEC GmbH 

Moderne Fluoreszenz-Marker enthalten neben dem eigentlichen chromophoren  $\pi$ -Elektronensystem, das für die optischen Eigenschaften verantwortlich ist, eine Reihe von

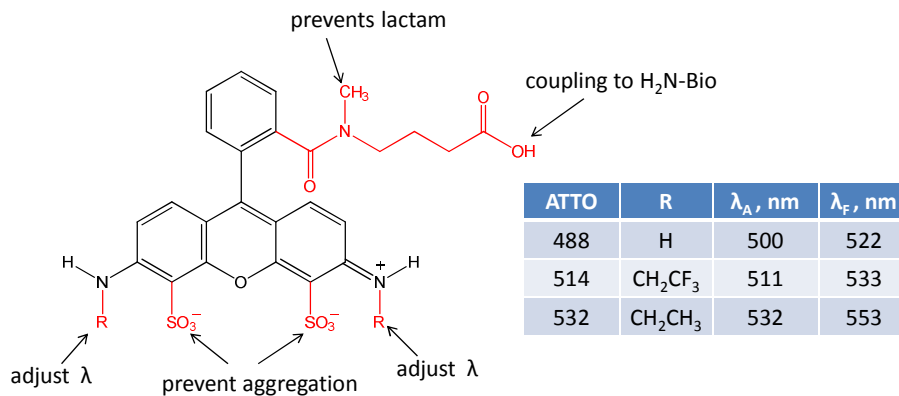


Substituenten und Funktionen, die den Farbstoff für biochemische Anwendungen optimieren. Dies sei exemplarisch in Bild 31 dargestellt.

### o-Carboxamide Coupling



31



J. Arden-Jacob, K.H. Drexhage, M. Hamers-Schneider, N. Kernitzer, A. Zilles  
 WO 2004/055117 (2002), US 7 935 822 (2011), EP 1 576 059 (2012)

ATTO-TEC GmbH 

#### Zum Abschluß einige zusammenfassende Anmerkungen:

- Die für die Fluoreszenz entscheidend wichtigen Prozesse der strahlungslosen Desaktivierung können immer noch nicht berechnet werden. Bei der praktischen Entwicklung neuer Farbstoffe helfen nur heuristisch gefundene einfache Konzepte weiter. Etwas überspitzt formuliert: *Die Quantenmechanik ist zwar richtig, aber unnützlich.*
- Die Fluoreszenz-Quantenausbeute organischer Farbstoffe nimmt zu längeren Wellen hin (Rot bis Infrarot) drastisch und unvermeidlich ab.
- Alle Fluoreszenz-Eigenschaften, insbesondere Quantenausbeute und Lebensdauer, hängen stark von der chemischen bzw. stofflichen Umgebung des Farbstoffs ab (im Vortrag nicht thematisiert).
- Beim Prozeß der Lichtemission verhält sich das elektronisch angeregte Molekül wie eine Dipol-Antenne (Hertz'scher Dipol), die elektro-magnetische Strahlung aussendet. Unabhängig von der chemischen Natur des Strahlers lassen sich so Richtungsabhängigkeit, Polarisation usw. quantitativ beschreiben. Die Förster'sche Energieübertragung stellt sich ganz einfach dar als Absorption eines Akzeptor-Moleküls im Nahfeld des Hertz'schen Dipols (Donor).
- Die Lichtemission (Fluoreszenz) eines Farbstoffmoleküls wird durch Reflektoren (Metallspiegel, dielektrische Grenzflächen) in der Nachbarschaft mehr oder weniger stark beeinflusst. Dies ist insbesondere bei fluoreszierenden Molekülen in nanostrukturierten Systemen zu berücksichtigen.

- Energieübertragung von einem elektrischen Quadrupol- oder magnetischen Dipol-Strahler als Donor ist über wesentlich größere Entfernungen möglich als im normalen (Förster) Fall des elektrischen Dipol-Strahlers.
- Durch Wechselwirkung der Chromophore in mehrfach gelabelten Konjugaten wird die Quantenausbeute reduziert und die Abklingfunktion kompliziert (nicht mehr monoexponentiell).
- Einen einzigen für alle denkbaren Anwendungen optimal geeigneten Fluoreszenz-Marker gibt es nicht und wird es auch nicht geben. Es sind weiterhin Kreativität und Experimentierfreude des Forschers nötig, um den für eine bestimmte Anwendung optimalen Farbstoff zu entwickeln.