

# F-Praktikum

## Zeitkorellierte Einzelphotonenzählung

Anna Andrlé (550727)  
Sebastian Pfitzner (553983)

18. November 2014

### Abstract

Im folgenden Versuch soll mithilfe eines Messplatzes zur Einzelphotonenzählung die Fluoreszenzkinetik von Pheophorbid a in Ethanol und wässriger Lösung untersucht werden. Dazu wird der Detektor zunächst auf ein ideales Signal-Rausch-Verhältnis eingestellt, eine Apparaterkurve aufgenommen und mögliche Störquellen untersucht. Für Pheo in EtOH ergibt sich eine Abklingzeit von  $\tau = (5,8 \pm 0,3)$  ns, in wässriger Lösung sinkt diese; wird zur Verhinderung der Aggregatbildung in Wasser Triton X-100 zugegeben, ergeben sich längere Abklingzeiten. Abschließend wird die Anisotropie untersucht und daraus Rückschlüsse auf die Molekülgröße gezogen.

### Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Apparatfunktion</b>	<b>1</b>
2.1. Einstellung des Lower Limit . . . . .	1
2.2. Einstellung der Detektorspannung . . . . .	2
<b>3. Pheophorbid a in Ethanol</b>	<b>3</b>
3.1. Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	3
3.2. Peak-Pile-Up-Effekt . . . . .	4
3.3. Reabsorbtion . . . . .	4
<b>4. Pheophorbid a in Wasser</b>	<b>5</b>
<b>5. Anisotropie</b>	<b>6</b>
<b>A. Abbildungen</b>	<b>8</b>

# 1. Einleitung

Als Fluoreszenz wird ein strahlender Übergang vom  $S_1$ - in den  $S_0$ -Zustand mit typischerweise sehr kurzer Abklingzeit ( $\tau = \mathcal{O}(\text{ns})$ ) bezeichnet. Mithilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonen-Messung (TCSPC) lässt sich der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz beobachten. Zu diesem Zweck werden mit einem Laser mit hoher Wiederholfrequenz sehr viele Messungen durchgeführt, bei denen jeweils die Zeit zwischen dem Laserpuls und dem Eintreffen des ersten Fluoreszenzphotons gestoppt wird. Das daraus entstehende Histogramm beschreibt die Fluoreszenzkinetik, da es sich um einen statistischen Prozess handelt.

Die so entstandenen Histogramme werden mit einem am Messplatz vorliegenden Software (TCSPC\_V3\_beta.exe) unter Berücksichtigung der zuvor aufgenommenen Apparatfunktion gefittet. Die hierbei gewonnenen Amplituden und Zeiten liegen ohne Fehlerangabe vor und bei den Amplituden ist auch keine Einheit gegeben. Da zweitens aber sowieso nicht für quantitative Betrachtungen verwendet wird, ist im restlichen Bericht die Amplitude in beliebigen Einheiten, a.u., angegeben.

Wird für Fits ein  $\chi^2$ -Wert angegeben, ist damit stets das reduzierte  $\chi^2/\text{DoF}$  gemeint. Alle Abbildungen sind im Anhang zu finden.

# 2. Apparatfunktion

Zur Durchführung möglichst rauscharmer Messungen ist es erforderlich, optimale Einstellungen für die Detektorspannung und das untere Limit des Comparators im CFD zu finden. Eine Apparatfunktion (auch IRF) wird aufgenommen, indem eine Küvette mit einem Streumedium (Ludox) in den Strahlengang gebracht wird und das daraus resultierende Signal aufgezeichnet wird.

## 2.1. Einstellung des Lower Limit

Das Lower Limit  $U_L$  des Comparators ist die Spannung, die ein vom Detektor abgegebener elektrischer Puls überschreiten muss, um aufgezeichnet zu werden. Im Folgenden soll untersucht werden, bei welchem  $U_L$  welches Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) auftritt und wie sich die anderen Signalcharakteristika verändern. Dazu werden bei einer festen Detektorspannung von 840 V verschiedene Apparatkurven aufgenommen, die dann ausgewertet werden können. Diese können sodann auf SNR, Halbwertsbreite, Maximum und Rauschen untersucht werden. Zusammenfassend sind diese Ergebnisse in Tabelle 1 aufgelistet; für ausgesuchte Werte von  $U_L$  ist die Apparatkurve in Abbildung 1 dargestellt.

Die bei  $U_L = 5 \text{ mV}$  Apparatkurve zeigt starke Artefakte nach dem Laserpuls, die nur um einen Faktor 3 kleiner als das Hauptmaximum sind. Das erklärt das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis – auch wenn “Rauschen” in diesem Zusammenhang nicht ganz korrekt ist; gemeint ist das Verhältnis zwischen erwünschtem Signal und unerwünschtem Untergrund.

Bei steigendem  $U_L$  ergibt sich eine monotone Verbesserung der SNR bis 50 mV, während das Signalmaximum kontinuierlich fällt. Die Halbwertsbreite des detektierten Pulses

$U_L$ [mV]	FWHM [ns]	max [counts]	offset [counts]	SNR
5	0,51	6757	1955	3,5
10	0,34	4096	8,0	513,8
20	0,34	3345	6,1	544,3
30	0,32	2436	4,4	554,8
40	0,32	1621	2,8	576,6
50	0,29	986	1,6	606,9
60	0,29	489	0,9	525,5

**Tab. 1:** Zusammenfassung der Apparatekurven-Charakteristika bei variablem Lower Limit  $U_L$ . “FWHM” ist die Halbwertsbreite der Apparatekurve, “max” die im Maximum desselben gemessene Anzahl von Ereignissen, “offset” der gemittelte Rauschhintergrund und “SNR” das Verhältnis dieser beiden Größen.

sinkt ebenfalls, allerdings für  $U_L > 5$  mV nur um eine Kanalbreite in 20 mV-Schritten (dies liegt an der beschränkten Zeitaufösung des Detektors mit einer Kanalbreite von rund 0,02 ns).

Für die nachfolgenden Messungen wird ein Lower Limit von  $U_L = 30$  mV verwendet, da dieser Wert einen guten Kompromiss zwischen gutem SNR und großer Signalintensität darstellt.

## 2.2. Einstellung der Detektorspannung

Die eingestellte Spannung bestimmt die Empfindlichkeit des Detektors – dies sorgt sowohl für ein stärkeres Signal als auch für ein verstärktes Rauschen. Das Rauschen kann in erster Näherung als linear mit der Detektorspannung wachsend angesehen werden, während das gewünschte Signal ab einer bestimmten Spannung in die Sättigung geht – nämlich dann, wenn alle erzeugten Photonen auch detektiert werden. Dem Versuchsskript [1] folgend wird eine Art Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt, dass für eine möglichst gute Messung groß sein sollte:

$$\text{SNR} = \frac{\sum_i \text{Signal}_i - \text{Untergrund}_i}{\sum_i \text{Untergrund}_i}. \quad (1)$$

$U$ [V]	700	800	888	900	1000
SNR	7,94	10,15	12,77	12,09	12,35

**Tab. 2:** Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses von der Detektorspannung.

Wie in Tabelle 2 dargestellt, ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei einer Detektorspannung von 888 V am Besten – diese wird demnach in allen nachfolgenden Messungen verwendet.

### 3. Pheophorbid a in Ethanol

Im Folgenden soll sowohl die Fluoreszenzlebenszeit von Pheophorbid in Ethanol bestimmt werden. Die Lebensdauer soll danach auf eine Abhängigkeit von der Leistung (Peak Pile Up Effekt) und der optischen Dichte untersucht werden. Die optische Dichte wurde mit Hilfe des Leitungsmessers bestimmt, dabei wurde einmal eine leere Küvette und einmal eine Küvette mit dem Stoff in den Laserpuls gestellt. Aus der Differenz folgt die optische Dichte. Dabei wurde nicht die maximale Leistung des Pulses gemessen sondern die gemittelte Leistung. Die Messungen wurden mit einem Polarisationsfilter bei einem Winkel von  $54^\circ$  zur Polarisationsrichtung des einfallenden Lichts gemacht.

Die für das Anpassen der Fluoreszenz-Kinetik verwendeten Funktionen sind im Allgemeinen Linearkombinationen von Exponentialfunktionen. Im Folgenden wird von einem mono- und einem bi-exponentiellen Fit gesprochen, was die Funktionen

$$\text{mono-exponentieller Fit: } f_m(t) = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + o \quad (2)$$

$$\text{bi-exponentieller Fit: } f_b(t) = A_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + o \quad (3)$$

meint. Da die zum Fitten der Fluoreszenzkinetik verwendete Software keine Unsicherheiten für die ermittelten Parameter ausgibt, wird die Unsicherheit der Abklingzeit bei "vernünftigen"  $\chi^2$ -Werten nahe bei 1 mit 5% der Zeit abgeschätzt. Der Parameter  $\tau_2$  aus in Gleichung (3) weiter i.A. deutlich fehlerbehafteter (insbesondere bei kleinen Amplituden  $A_2$ ) – da für die folgenden quantitativen Untersuchungen dieser Parameter ebenfalls wie die Amplituden und mögliche Offsets keine Rolle spielen, ist eine Fehlerabschätzung nicht unbedingt nötig.

#### 3.1. Fluoreszenzlebensdauer

Es wurde Pheophorbid a in Ethanol gelöst. Die entstehende Lösung hatte eine optische Dichte von 0,14.

Es wird einmal eine mono-exponentielle Funktion angefitet (Abbildung 2) und einmal eine bi-exponentielle Funktion (Abbildung 3). Fitparameter:

mono-exp. Fit :

$$A = 0,23 \text{ au} \quad \tau = (5,8 \pm 0,3) \text{ ns} \quad \chi^2 = 3,5$$

bi-exp. Fit :

$$A_1 = 0,23 \text{ au} \quad \tau_1 = (5,8 \pm 0,3) \text{ ns} \quad A_2 = 0,003 \text{ au} \quad \tau_2 = (0,38 \pm 0,02) \text{ ns} \quad \chi^2 = 1,3$$

Man kann feststellen, dass der bi-exponentielle Fit einen besseren  $\chi^2$ -Wert liefert als der mono-exponentielle Fit mit  $\chi^2 = 3,5$ , aber die Unterschiede in der Fluoreszenz-Abklingzeit sind vernachlässigbar klein. Der bi-exponentielle Fit passt insbesondere bei kurzen Zeiten im Bereich um den Anregungspuls besser. Daraus folgt auch der geringe  $\chi^2$  Wert. Gerade am Anfang des Laser-Pulses werden mehr Photonen emittiert als der mono-exponentielle Fit erwarten ließe. Aus dem Fit folgt eine Lebensdauer von  $\tau = (5,8 \pm$

0,3) ns. Der Fehler wurde aus wiederholten Fits und den Unsicherheiten des Experiment (Rauschen des Detektors) abgeschätzt. Der so ermittelte Wert für die Fluoreszenz-Abklingzeit stimmt gut mit dem Literaturwert von  $6,1 \pm 0,2$  ns [2] überein; die Fehlergrenzen überschneiden sich.

### 3.2. Peak-Pile-Up-Effekt

Es wurde hier die Intensität des Lasers verändert und die dazugehörige Kurve aufgenommen und gefittet (Abbildung 4). Aus dem Fit wurden dann jeweils die Fluoreszenzlebensdauer entnommen.

Es fällt auf, dass die Amplitude linear mit der Leistung des Lasers geht (Tabelle 3) und die Lebensdauer größer wird (von 5,6 ns zu 5,9 ns). Auch liefert hier der bi-exponentielle Fit einen besseren  $\chi^2$  Wert (1,02 bis 1,55) als der mono-exponentielle Fit (1,10 bis 2,31). Dabei scheint gerade bei einer geringen Leistung der Unterschied zwischen Bi und MonoFit am geringsten. Die vorangegangene Lebensdauerermessung lässt sich nicht genau in diese Reihen einfügen, da die Konzentration von Pheophorbid a ein wenig anders war. Aus den hier gemessenen Werten lässt sich der Peak-Pile-Up-Effekt nicht erkennen, da die Lebensdauer im Rahmen der Fehler annähernd konstant bleibt.

Leistung [ $\mu$ W]	Mono-Exponentiell			Bi-Exponentiell				
	A [a.u.]	$\tau$ [ns]	$\chi^2$	A <sub>1</sub> [a.u.]	$\tau_1$ [ns]	A <sub>2</sub> [a.u.]	$\tau_2$ [ns]	$\chi^2$
4,2	6	5,6	1,10	6	5,6	8	0,002	1,02
18,7	28	5,7	1,64	27	5,8	45	0,002	1,10
41	62	5,8	2,31	61	5,7	3	0,430	1,14
63	94	5,7	1,75	93	5,8	149	0,009	1,55
90	131	5,8	2,02	127	5,9	9	0,670	1,40
125	171	5,9	1,81	170	5,8	10	0,615	1,29

Tab. 3: Mono- und bi-exponentielle Fits bei verschiedenen Laserleistungen (cw).

### 3.3. Reabsorbtion

Es wurde eine hoch konzentrierte Probe von Pheophorbid a in Ethanol hergestellt und diese wurde schrittweise verdünnt. Dabei wurde die optische Dichte gemessen und die dazugehörigen Graphen aufgenommen und gefittet (Abb.: 5). Man kann erkennen, dass bei einer geringen Konzentration und optischen Dichte die Amplitude größer ( $A = 234$  au) ist als bei den größeren Konzentrationen ( $A = 56,8$  au) (Tabelle 4). Auch wird die Lebensdauer deutlich größer bei größerer optischen Dichte (von  $\tau = 5,6$  ns zu  $\tau = 6,4$  ns). Die längere Lebensdauer kann man durch die Reabsorption erklären. Bei einer höheren Konzentration ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass nach dem ein Photon von dem Moleküle emittiert wird, es noch einmal von einem anderen absorbiert wird, das verlängerte die Lebensdauer. Der Unterschied zwischen dem bi- und mono-exponentiellen Fit ist bei der geringsten optischen Dichte am größten ( $\tau_{\text{mono}} = 5,6$  ns und  $\tau_{\text{bi}} = 5,8$  ns). Die erste Lebensdauer wurde bei einer optischen Dichte von 0,14 gemessen und und passt so

in die Reihe rein. Bei geringer Konzentration und optischer Dichte lässt sich die Kurve anscheinend besser durch einen bi-exponentiellen Fit beschreiben. Das erwartete Ergebnis tritt ein, die Lebensdauer wird auch im Rahmen der Fehler länger.

OD	Mono-Exponentiell			Bi-Exponentiell				
	A [a.u.]	$\tau_1$ [ns]	$\chi^2$	$A_1$ [a.u.]	t1 [ns]	$A_2$ [a.u.]	$\tau_2$ [ns]	$\chi^2$
0,12	234	5,6	2,48	226	5,8	33	0,372	1,23
0,40	234	6,0	1,85	231	6,1	544	0,001	1,46
0,60	184	6,2	1,96	180	6,2	446	0,001	1,50
0,80	132	6,3	1,98	129	6,4	24	0,215	1,16
1,00	89	6,3	1,81	86	6,5	354	0,001	1,54
1,30	57	6,4	1,70	55	6,6	232	0,002	1,31

**Tab. 4:** Mono- und bi-exponentielle Fits für Pheophorbid in Ethanol bei verschiedenen optischen Dichten.

## 4. Pheophorbid a in Wasser

Soll Pheo in Wasser gelöst werden, so neigt dieses aufgrund seiner hydrophoben Natur zur Aggregatbildung. Diese Molekülgruppen fluoreszieren fast gar nicht mehr, da durch ihren komplexeren Aufbau weitere Entleerungskanäle aus dem  $S_1$ -Zustand existieren.

Im Folgenden soll nun die Änderung der Fluoreszenzkinetik in verschiedenen wässrigen Lösungen untersucht werden. Dazu wird eine gleichbleibende Menge von Pheo in Ethanol-Wasser-Gemischen gelöst, sodass die optische Dichte konstant bei 0,14 bleibt.

EtOH	H <sub>2</sub> O	Mono-Exponentiell			Bi-Exponentiell					
		A [a.u.]	$\tau$ [ns]	$\chi^2$	$A_1$ [a.u.]	$\tau_1$ [ns]	$A_2$ [a.u.]	$\tau_2$ [ns]	$\chi^2$	
0	2	-	-	-	4	3,98	17	0,07	1,2	
0,5	1,5	50	5,11	1,6	48	5,30	6	0,42	1,4	
1	1	205	5,68	2,5	198	5,67	40	0,32	1,3	
1,5	0,5	231	5,72	2,2	227	5,73	29	0,40	1,3	
2	0	233	5,82	2,6	226	5,93	33	0,39	1,4	
mit Triton:										
0	2	132	6,24	1,8	131	6,32	9	0,47	1,4	

**Tab. 5:** Fits für die Pheo-Kinetik in verschiedenen Wasser-Ethanol-Gemischen. Liegt der Pheo-Ansatz in purem Wasser gelöst vor, so ist ein mono-exponentieller Fit nicht möglich.

Die Abklingzeit wird kürzer, je mehr Wasser als Lösemittel verwendet wird (vgl. Abbildung 6). Dieses Resultat ist konsistent mit [2], wo für Pheo in wässriger Lösung (mit Phosphatbuffer) eine Abklingzeit von  $(4,7 \pm 0,2)$  ns festgestellt wird. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt bei steigendem Wasser-Anteil stark ab – wird die Stammlösung mit

purem Wasser verdünnt, ist das Signal sehr schwach und lässt sich selbst mit dem bi-exponentiellen Modell nur unter Schwierigkeiten fitten.

Eine Erklärung für beide Effekte ist die Aggregatbildung von Pheo in wässrigen Lösungen, die die Molekülstruktur verändern.

Unter Zugabe von Triton X-100, welches dank der hydrophilen als auch hydrophoben Anteile sowohl an Pheo als auch Wasser binden kann, entstehen Mizellen. Diese Anordnungen sind wasserlöslich; es kommt zu keiner Aggregatbildung. Folglich ist die Fluoreszenzkinetik ähnlich zu der von Pheo in Ethanol. Interessanterweise ist die Abklingzeit mit Triton als Detergenz signifikant größer als in reinem Ethanol, stimmt aber innerhalb der Fehlertoleranzen noch mit dem in [2] gegebenem Referenzwert überein.

## 5. Anisotropie

Die Pheophorbid-Moleküle absorbieren das polarisierte Licht des Laserpulses bevorzugt dann, wenn der Winkel zwischen ihrem Übergangsdipolmoment und der Polarisationsrichtung klein ist. Da sich die Moleküle drehen, ist die Polarisationsrichtung der emittierten Photonen im Allgemeinen nicht identisch mit der der absorbierten Photonen. Wird mit einem Polarisationsfilter vor dem Detektor nur eine Richtung des polarisierten Lichts durchgelassen, so lässt sich der zeitliche Verlauf der Anisotropie der Polarisationsrichtung bestimmen [1].

Die Anisotropie  $r$  ergibt sich durch

$$r(t) = \left| \frac{I_p(t) - I_s(t)}{I_p(t) + 2I_s(t)} \right|, \quad (4)$$

wobei  $I_p$  und  $I_s$  die Intensitäten des parallel bzw. senkrecht zum einfallenden Licht polarisierten Fluoreszenzlichts sind. Aus der Messung der Intensitäten lässt sich also das zeitliche Verhalten der Anisotropie charakterisieren. Für ein sphärisches Molekül ist zu erwarten, dass sie exponentiell mit einer Zeitkonstante  $\tau_A$  abklingt:

$$r(t) = R_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_A}\right) \quad \tau_A = \frac{\eta V}{k_B T}. \quad (5)$$

$\eta$  ist hier die Viskosität,  $V$  das Volumen eines Moleküls,  $k_B$  die Boltzmannkonstante und  $T$  die Temperatur.

Zur Bestimmung des  $\tau_A$  werden in beiden Polfilterstellungen Messkurven aufgenommen, diese bei gleichen Voreinstellungen gefittet und aus den sich so ergebenden Kurven nach Gleichung 4 die zeitabhängige Anisotropie bestimmt. Steht der Polfilter senkrecht zur Polarisationsrichtung des einfallenden Lichts ist ein mono-exponentieller Fit möglich; bei paralleler Ausrichtung aufgrund der Überlagerung mit der sich verändernden Anisotropie nicht.

Der zeitliche Verlauf der Anisotropie für Pheo in Ethanol (siehe Abbildung 7) entspricht der Erwartung eines einfach-exponentiellen Verlaufs (wie oben definiert). Die Abklingzeit beträgt  $(0,33 \pm 0,03)$  ns und einer Amplitude von  $0,19 \pm 0,02$ , wobei die Fehlerangaben nur Abschätzungen von 10 % des eigentlichen Wertes darstellen. Der Offset  $o$  liegt erwartungsgemäß bei Null.

Im Fall des in Wasser gelösten Pheos unter Zugabe von Triton X-100 ergibt sich der theoretische Verlauf nur für kurze Zeiten. Die ersten 4 ns lassen sich noch einfach-exponentiell anfitzen (wie in Abbildung 8a gezeigt), allerdings ist der nachfolgende Verlauf linear abklingend. Mit einer dementsprechend zusammengesetzten Funktion  $f(t) = A \cdot \exp(-t/\tau) + a \cdot t + o$  lässt sich die Änderung der Anisotropie (vgl. Abbildung 8b) auch für lange Zeiten (im Bereich von 15 ns) noch gut fitten. Es ergibt sich eine erwartungsgemäß längere Abklingzeit von  $(1,1 \pm 0,1)$  ns beim Fit mit zusätzlichem linearen Term und  $(1,3 \pm 0,1)$  ns ohne diesen.

Aus Gleichung (6) wird ersichtlich, dass  $\tau_A \propto \eta \cdot V$ . Die Viskosität von Wasser beträgt  $\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 1,0$  mPa s, die von Ethanol  $\eta_{\text{EtOH}} = 1,2$  mPa s (bei Raumtemperatur). Daraus folgt für die Volumenänderung durch die Bildung von Mizellen

$$\frac{V_{\text{Mi}}}{V_{\text{EtOH}}} = \frac{\eta_{\text{EtOH}}}{\tau_{\text{EtOH}}} \cdot \frac{\tau_{\text{Mi}}}{\eta_{\text{Mi}}} \approx 1,2 \cdot \frac{(1,1 \pm 0,1) \text{ ns}}{(0,33 \pm 0,03) \text{ ns}} = 4,0 \pm 0,6. \quad (6)$$

Ebenfalls aus Gleichung (6) ergibt sich für Pheo (ohne und mit Triton X-100) ein Radius von

$$R_{\text{Pheo}} = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} \frac{k_{\text{B}} T \tau_{\text{EtOH}}}{\eta_{\text{EtOH}}}} \approx 0,6 \text{ nm}$$

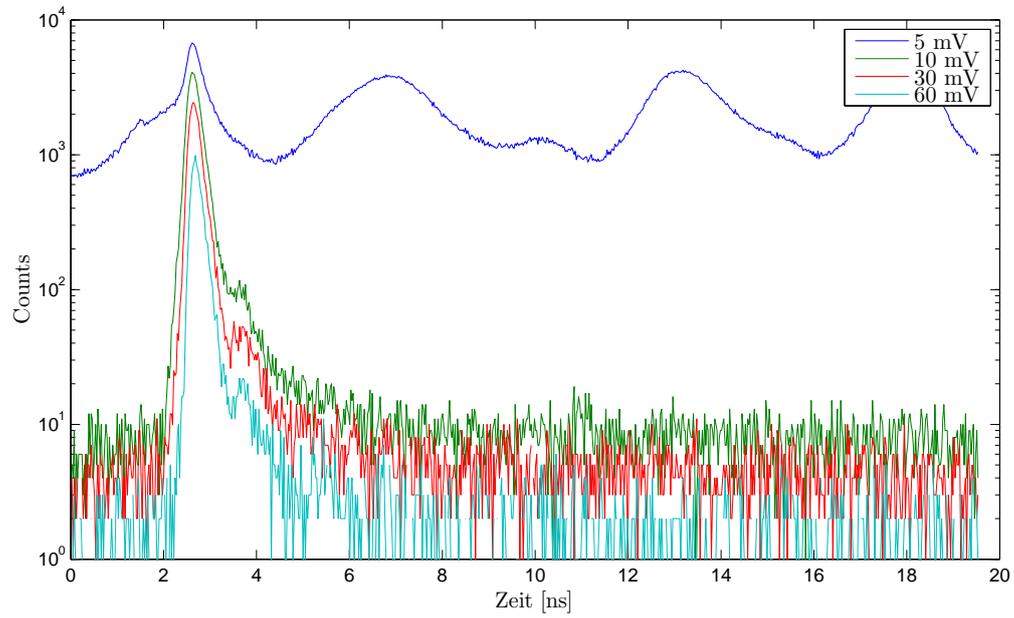
$$R_{\text{Triton}} = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} \frac{k_{\text{B}} T \tau_{\text{H}_2\text{O}}}{\eta_{\text{H}_2\text{O}}}} \approx 1,1 \text{ nm},$$

falls von sphärischen Molekülen ausgegangen werden kann. Diese Werte sind nur grobe Abschätzungen, weswegen auf eine Angabe der Unsicherheiten verzichtet wurde. Insbesondere liegt das daran, dass die zu Beginn gemachte Näherung eines sphärischen Moleküls bei Pheo zwar noch gut zutrifft, wie sich aus dem erfolgreichen Fit ersehen lässt, bei Pheo-Triton X-100-Komplexen aber fehlschlägt. Dies äußert sich im zusätzlichen Term, der für die Beschreibung der Anisotropie dieses Komplexes nötig ist.

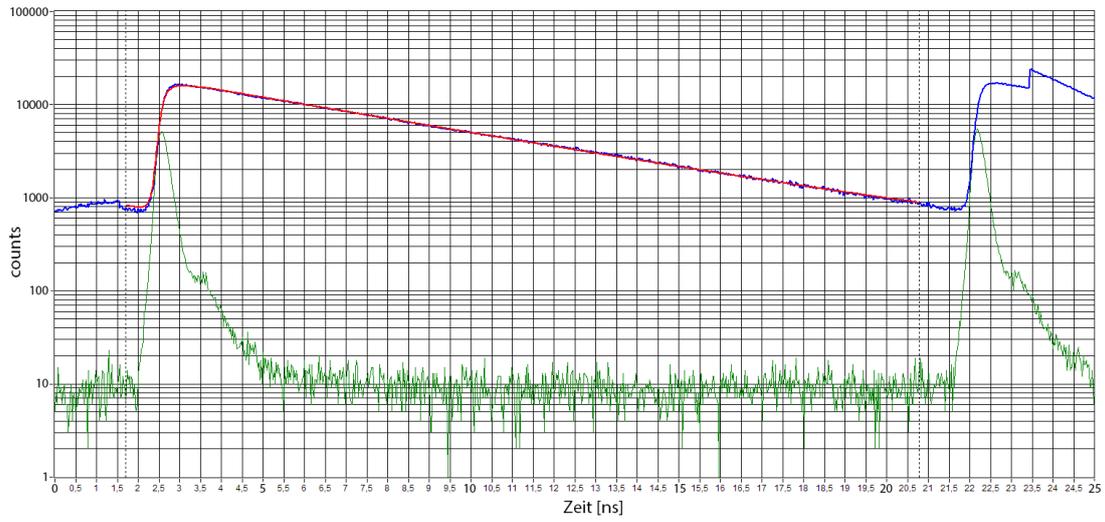
## Literatur

- [1] HACKBARTH, S.: Versuchsskript: Zeitkorellierte Einzelphotonenzählung. 2014.
- [2] RÖDER, B. und WABNITZ, H.: Time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin, mesoporphyrin, pheophorbide a and chlorin e<sub>6</sub> in ethanol and aqueous solution. 1987.

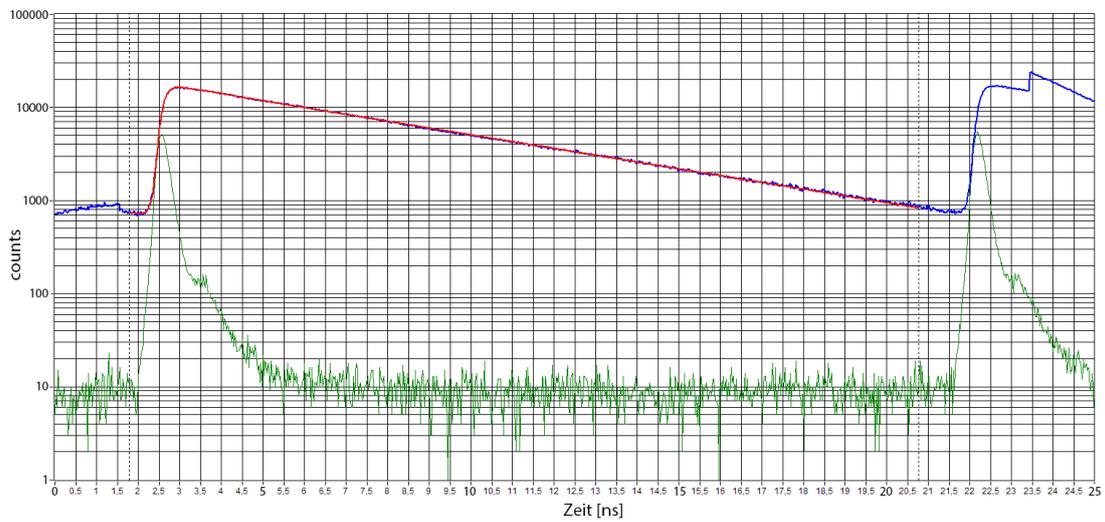
## A. Abbildungen



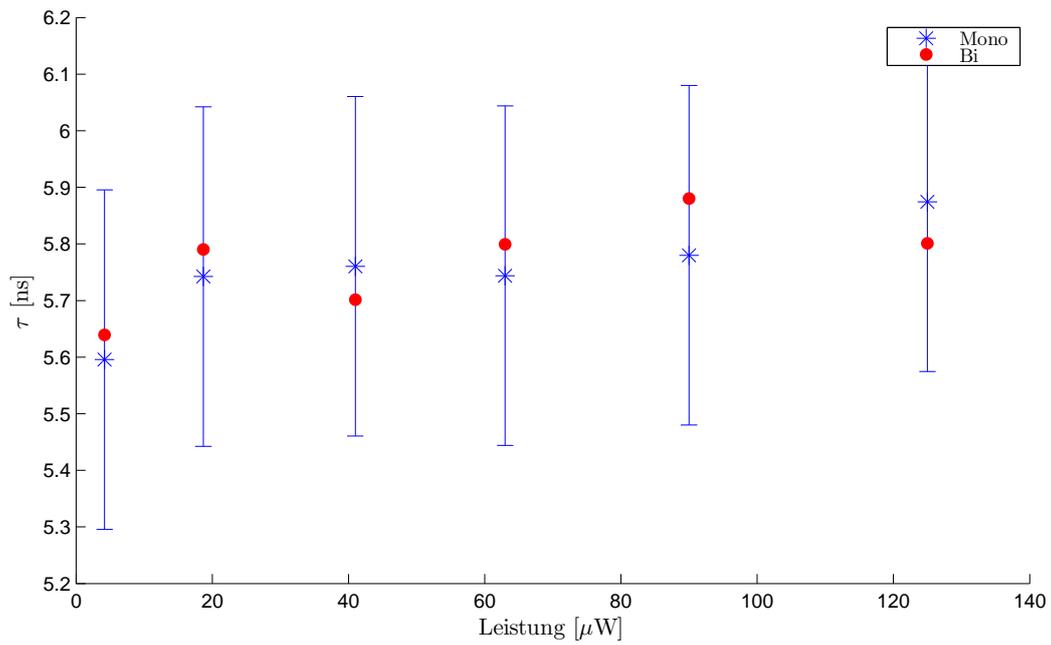
**Abb. 1:** Apparatefunktionen bei ausgewählten  $U_L$  und konstanter Detektorspannung von 840 V. Die Kurve für  $U_L = 5$  mV ist aufgrund der Artefaktbildung nicht für Messungen brauchbar.



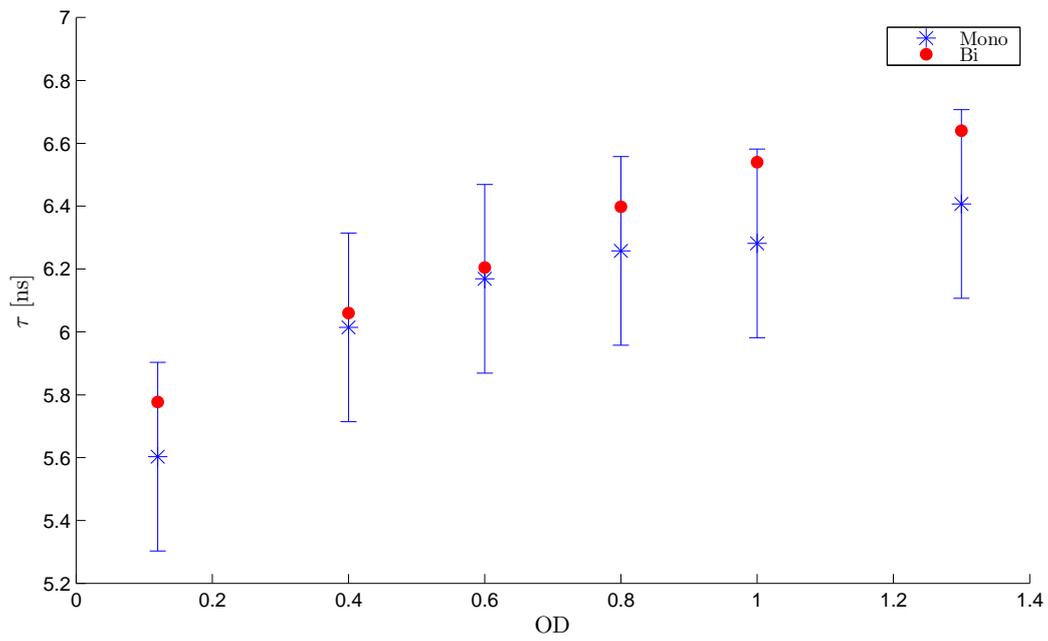
**Abb. 2:** Bestimmung der Fluoreszenz-Abklingzeit mit einem mono-exponentiellen Fit. Fitparameter:  $A = 0,228$ ,  $\tau = (5,8 \pm 0,3)$  ns,  $\chi^2 = 3,5$



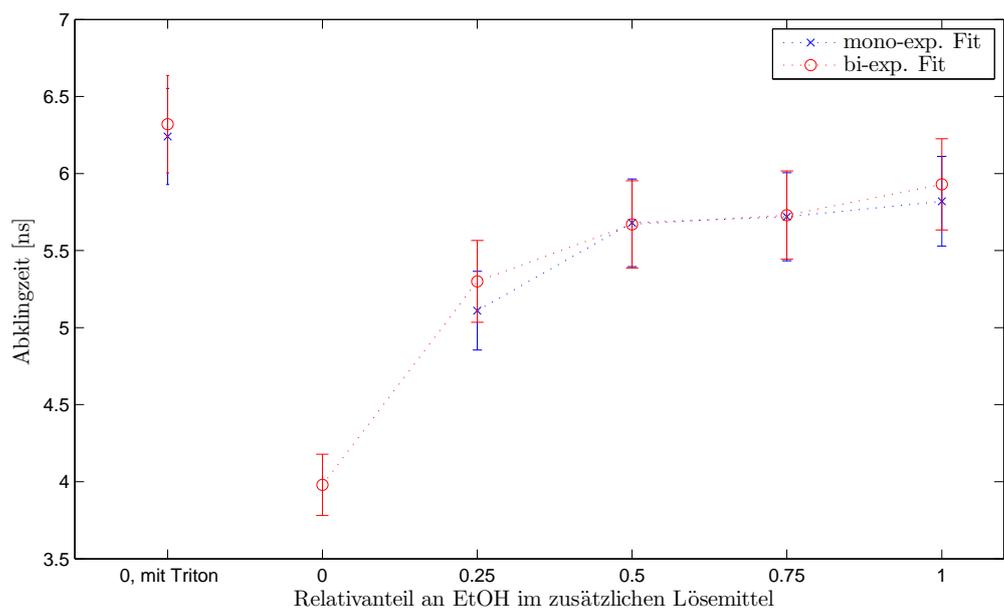
**Abb. 3:** Bestimmung der Fluoreszenz-Abklingzeit mit einem bi-exponentiellen Fit. Fitparameter:  $A_1 = 0,228$ ,  $\tau_1 = (5,8 \pm 0,3)$  ns,  $A_2 = 0,003$ ,  $\tau_2 = (0,38 \pm 0,02)$  ns,  $\chi^2 = 1,3$



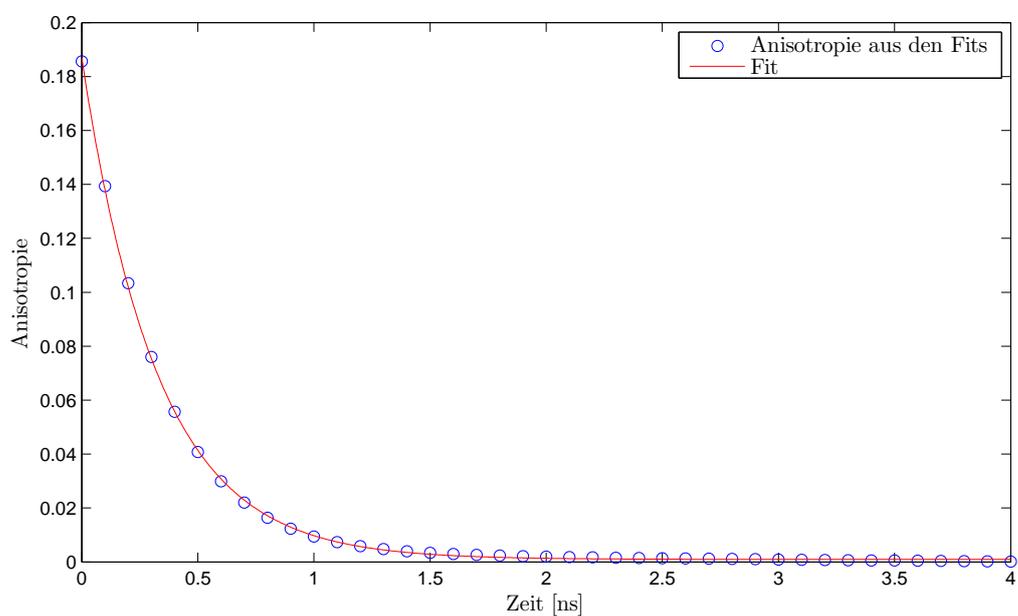
**Abb. 4:** Darstellung der Lebensdauer in Abhängigkeit der Leistung. Die Unsicherheiten sind mit 5% abgeschätzt, beim bi-exponentiellen Fit wird auf die Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.



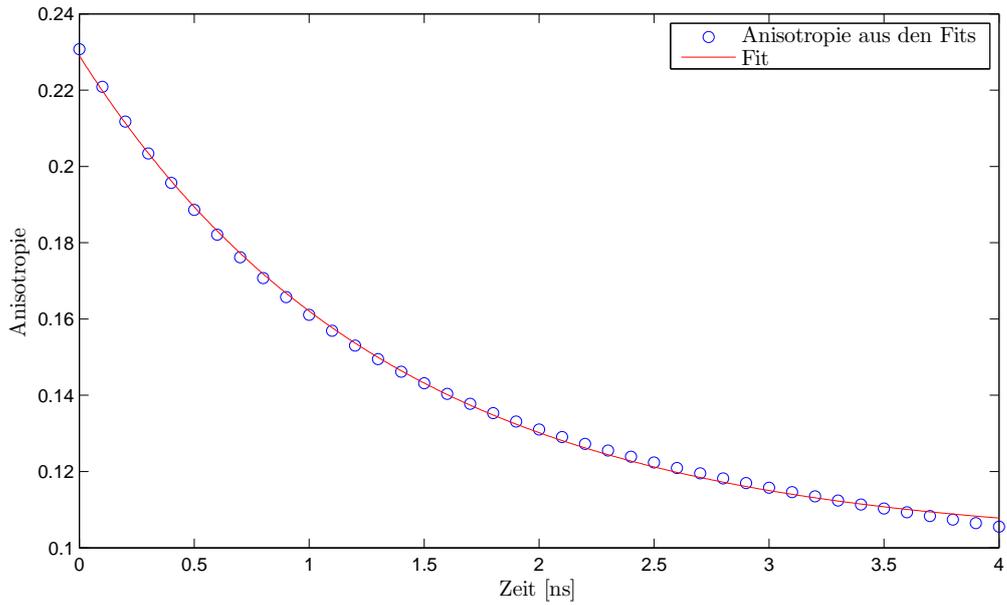
**Abb. 5:** Darstellung der Lebensdauer in Abhängigkeit der optischen Dichte zur Veranschaulichung der Reabsorption. Die Unsicherheiten sind mit 5% abgeschätzt, beim bi-exponentiellen Fit wird auf die Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.



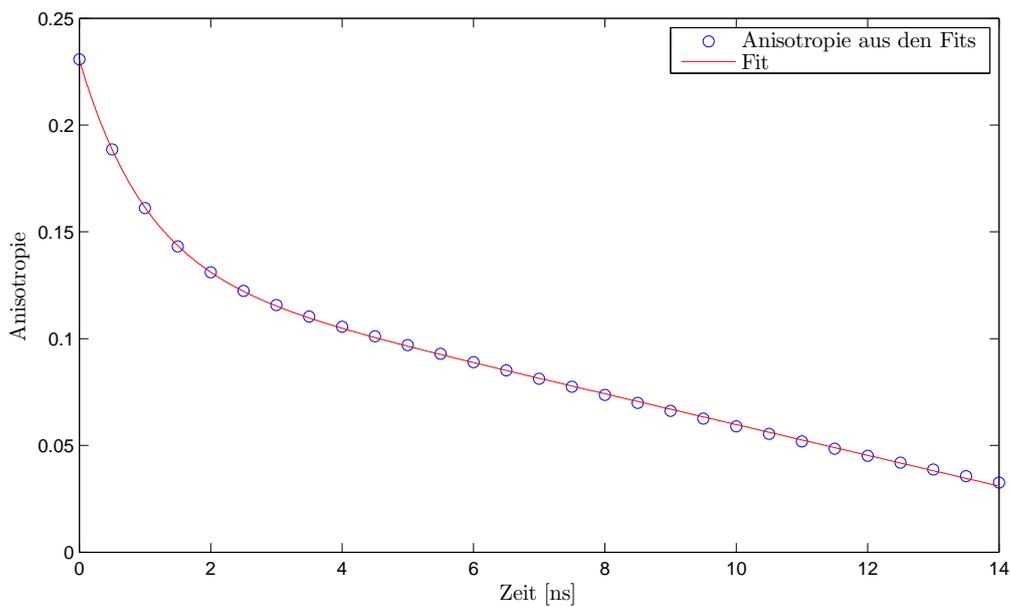
**Abb. 6:** Fluoreszenzabklingzeiten von Pheo in verschiedenen EtOH-H<sub>2</sub>O-Gemischen sowie mit reinem Wasser und Triton X-100. Wird die Pheo-Stammlösung mit reinem Wasser verdünnt, ist keine mono-exponentieller Fit mehr möglich.



**Abb. 7:** Fit für den zeitlichen Verlauf der Anisotropie  $r$  von Pheo in Ethanol. Als Abklingzeit wird hier  $(0,33 \pm 0,03)$ ns bestimmt.



(a) Einfach-Exponentieller Fit.



(b) Einfach-Exponentieller Fit mit linearem Term:  $f(t) = A \cdot \exp(-t/\tau) + a \cdot t + o$ .

**Abb. 8:** Fit für den zeitlichen Verlauf der Anisotropie  $r$  von Pheo in Ethanol und Wasser unter Beigabe von Triton X-100. Als Abklingzeiten werden hier  $(1,3 \pm 0,1)$  ns bzw.  $(1,1 \pm 0,1)$  ns bestimmt.