



DEUTSCHE
GESELLSCHAFT FÜR
ZERSTÖRUNGSFREIE
PRÜFUNG E.V.

ZfP-Sonderpreis der DGZfP beim Landeswettbewerb Jugend forscht

BAYERN



Fluoreszenzpolarisation - Drehungen im Gigahertzbereich

Maria Hoyer

Schule:

Gymnasium Gröbenzell

Fluoreszenzpolarisation: Drehungen im Gigahertzbereich

Maria Hoyer

Einleitung -----	1
Stand der Technik -----	1
Vorgehensweise -----	3
Mikroskopaufbau -----	3
Aufbau ohne Mikroskop -----	3
Proben -----	4
Ergebnisse -----	5
Verbesserung der optischen Qualität des Fluoreszenzmikroskops -----	5
Charakterisierung des Messaufbaus -----	5
Bestimmung des Rotationsvolumens Acridin Orange -----	7
Bestimmung der Mikroviskosität von DNA durch Acridin Orange -----	8
Messung der kritischen Konzentration von SDS zur Micellen - Bildung-----	9
Diskussion -----	13
Literaturverzeichnis -----	15

Einleitung

Fluoreszenzfarbstoffe werden in vielen biologischen Bereichen angewendet. Dabei ist wichtig, dass die Farbstoffe in die nachzuweisenden Strukturen an- oder eingelagert werden. Nach Anregung mit kurzweiligem Licht kann die längerwellige Fluoreszenz Aufschlüsse auf die chemische Natur der Probe geben. So können mit ihrer Hilfe wichtige Zellbestandteile selektiv angefärbt und so frühzeitig Veränderungen festgestellt werden, was vor allem in der Medizin von großer Bedeutung ist.

In meiner Jugend-Forscht-Arbeit 2006 habe ich mit einfachen Mitteln ein Fluoreszenzmikroskop gebaut und die Funktionsfähigkeit bis in den Mikrometerbereich nachgewiesen. Im Jahr darauf habe ich gezeigt, dass durch Verwendung eines Laserpointers ein mikroskopischer Aufbau mit einer Höhengauflösung im Bereich von Nanometern bei mikrometergenauer lateraler Auflösung möglich ist. Über die Fortsetzung dieser Arbeiten in Richtung auf weitere Mikroskopieverfahren bin ich auf die interessante richtungsabhängige Fluoreszenz von Farbstoffen unter Anregung mit polarisiertem Licht gestoßen, die ich in dieser Arbeit vorstellen möchte.

Die anisotropen Eigenschaften der Farbstoffmoleküle bieten auch die Möglichkeit, die Bewegung von Molekülen im Nanosekundenbereich (entspricht Gigahertzbereich auf der Frequenzebene) mit einfachen Mitteln nachzuweisen. Somit kann mit der Fluoreszenzpolarisation zusätzlich zur Fluoreszenzintensität oder die emittierte Wellenlänge auf die chemische Umgebung der Farbstoffe geschlossen werden. Zum Beispiel kann durch die Fluoreszenzpolarisation eines Farbstoffs, angelagert an ein anderes Molekül - beispielsweise DNA - die Beweglichkeit dieses Gesamtkomplexes bestimmt werden. Damit ist auch der jeweilige Zustand des Farbstoffs im Medium, beispielsweise die Viskosität oder Stabilität bestimmt, was auch bei Untersuchungen von Membranen eine wichtige Rolle spielt. Über die Diskussion mit den Juroren beim Wettbewerb bin ich auf die nähere Charakterisierung der chemischen Wechselwirkung zwischen Farbstoffen und anderen Molekülen gekommen.

Stand der Technik

Die Anisotropie der Fluorochrome lässt sich am besten erklären, wenn man sich den angeregten Komplex als Dipol vorstellt. Der Dipol der Farbstoffe wird bei der Anregung mit dem Dipol der Photonen in Schwingung versetzt. Die Farbstoffmoleküle besitzen eine Vorzugsrichtung für die Absorption, daher ist für das einzelne Farbstoffmolekül ein Unterschied gegeben, in welche Richtung das ankommende Licht schwingt. Vergleichbares gilt auch für die Aussendung von Licht, die Fluoreszenz. Unter einfachen Bedingungen kann man diese Polarisation nicht sehen, da die optischen Eigenschaften vieler Farbstoffmoleküle in Lösung einen Mittelwert ergeben, der gemessen wird. Wird aber mit bereits polarisiertem Licht angeregt, so wird die Schwingungsrichtung der Fluoreszenz bevorzugt in die zur Anregung parallele Richtung entsprechend dem Dipol des Moleküls erfolgen. (Urbanke, Curth)

Da sich der energetische Zustand und damit auch die Bindungsenergien vom Grundzustand zum Anregungszustand ändert, ändert sich auch der Winkel zwischen dem unangeregten und angeregten Dipol. Es besteht also eine Grundpolarisation des Fluorochroms, wenn sich das Molekül während der

Fluoreszenzlebensdauer nicht dreht. Diese intrinsische Anisotropie $A_0 = \frac{1}{5}((3 \cos^2 \alpha) - 1)$, bei der α der Winkel zwischen Anregungs- und Emissionsdipolmoment ist, entspricht der Anisotropie eines Farbstoffs in starren Lösungen. (Urbanke, Curth) Der Winkel α ist normalerweise recht klein, bei sehr komplizierten Molekülen können die Dipole des Grundzustand und des ersten angeregten Zustands allerdings auch annähernd senkrecht aufeinander liegen. (Universität Jena) Die Änderung der Polarisation des Lichtes, die über diese intrinsische Anisotropie hinausgeht, gibt Aufschluss über Rotationsvolumen, Anregungszeit und Viskosität des Stoffes, in dem der Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist. (Urbanke, Curth)

Die Fluoreszenzpolarisation ist definiert durch $P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$, die Fluoreszenzanisotropie als $A = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$,

wobei $I_{||}$ und I_{\perp} die Intensitäten in der Filterstellung, in der die Intensität minimal bzw. maximal sind, bedeuten. (Universität Jena)

Zur Messung der Lebensdauer oder des Rotationsvolumens eines Fluorochroms gibt es sehr aufwendige Verfahren, zum Beispiel Messung der Abschwächung der Fluoreszenzintensität in beiden Polarisationsrichtungen nach Beendigung der Anregung im Nanosekundenbereich. Es gibt allerdings noch eine andere Möglichkeit, die Lebensdauer oder das Rotationsvolumen über die Anisotropie zu bestimmen. Dabei wird die so genannte Perrin-

Gleichung verwendet: $\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{\tau_F k T}{V \cdot \eta}\right)$, wobei A die Anisotropie; k die Boltzmannkonstante; τ die

Fluoreszenzlebensdauer; T die Temperatur; V das Rotationsvolumen und η die Viskosität ist. (Urbanke, Curth) Voraussetzung für die Verwendung der Perrin-Gleichung ist, dass das Molekül rotationssymmetrisch ist und dass nur eine Rotationskorrelationszeit vorkommt. Man kann also durch über alle Zeiten gemittelte Werte der Anisotropie auf Vorgänge im Nanosekundenbereich schließen.

Eine der hier verwendeten Proben, SDS (Natriumdodecylsulfat) (Stanislaus) ist amphiphil, hat also einen polaren und einen unpolaren Teil. In Wasser bilden sich so ab einer bestimmten Konzentration sogenannte Micellen, das heißt die unpolaren Teile lagern sich zu einem Ring zusammen, während die polaren Teile nach außen hin an das Wasser binden. Aufgrund dieser Eigenschaft fungiert es auch als Emulgator. (Wikipedia1)

Die kritische Konzentration (CMC; Critical Micelle Concentration), ab der die Micellenbildung stattfindet, ist eine wichtige Konstante für die Bestimmung von grenzflächenaktiven Substanzen. Da sich ab der CMC die polaren Teile des Tensids mit größerer Wahrscheinlichkeit begegnen und miteinander wechselwirken können, sind sie in der Lage sich enger zusammenzulagern. (Räbiger) Ist ein Farbstoff in diese Umgebung eingelagert, lässt sich über die Änderung der Polarisation die CMC herausfinden. (Thorsteinsson) Andere Verfahren der Bestimmung der CMC liegen in der Messung der Leitfähigkeit, der Lichtstreuung oder der Oberflächenspannung der Lösung. Diese Verfahren sind aber nicht auf die Untersuchung von biologischen Membranen übertragbar. (Mykytczuk)

Vorgehensweise

Mikroskopaufbau

Der Aufbau des Fluoreszenzmikroskops ist bereits in meiner Jugend-Forscht-Arbeit 2006 beschrieben worden. (M. Hoyer) Der im Fluoreszenzmikroskop verwendete Aufbau, bei dem je ein Polarisationsfilter vor die Probe und hinter die Probe gelegt wurde, diente zunächst der Verminderung von Streulicht aus der Anregung.

In einer Probe, die aus vielen verschiedenen Einzelteilen besteht, wie zum Beispiel einer Zelle, lässt sich Streuung nicht verhindern.

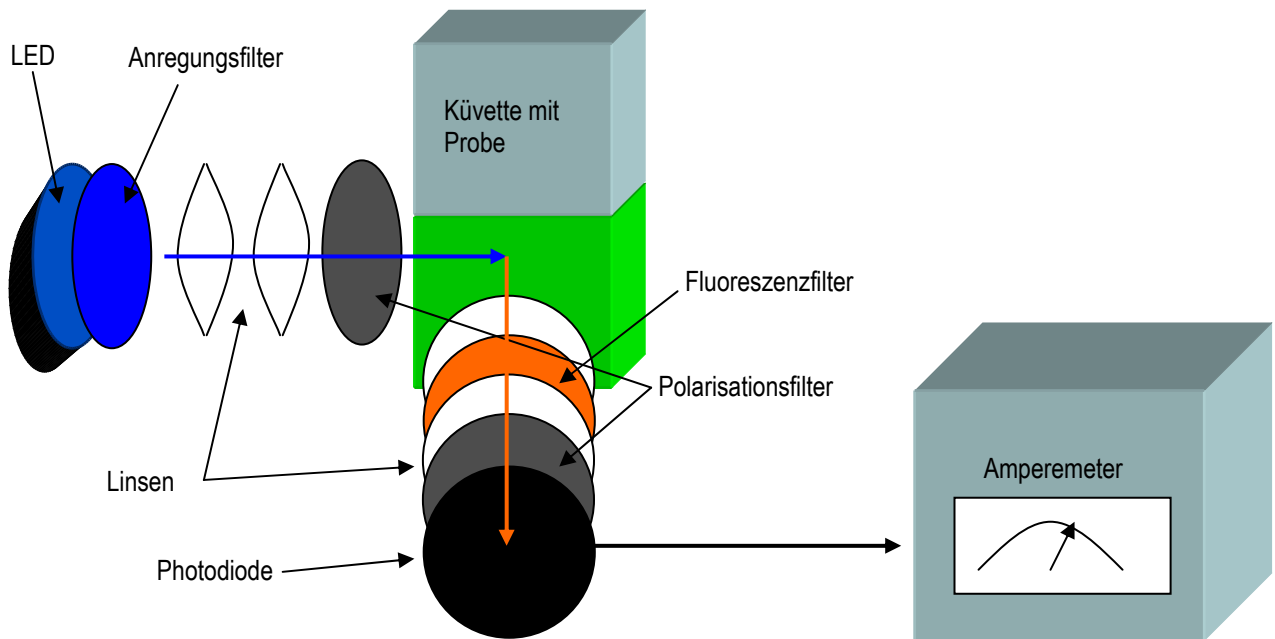
Bei paralleler Stellung der Polarisationsfilter wird das polarisierte Streulicht ausgeblendet; der Kontrast wird verringert. Bei senkrechter Stellung kann nur der unpolarisierte oder gedrehte Anteil des Fluoreszenzlichts gemessen werden.

Aufbau ohne Mikroskop

Um die Fluoreszenzpolarisation zu bestimmen, werden im Strahlengang vor und hinter die Probe Polarisationsfilter gesetzt. In Abhängigkeit der Ausrichtung der Filter zueinander werden die jeweiligen Intensitäten bestimmt und daraus die Fluoreszenzpolarisation errechnet. (Universität Jena)

Um eine möglichst genaue und feste Messvorrichtung zu haben, befestigte ich die einzelnen Komponenten nach Art einer optischen Bank. Als Lichtquelle diente mir eine blaue LED, die ihr Emissionsmaximum bei 450nm hat, bei der die hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe gut angeregt werden können. Das durch eine käufliche Linsenvorrichtung parallelisierte Licht wird durch eine sphärische Linse mit der Brennweite $f = 4\text{cm}$ auf die Mitte einer Glasküvette, in der sich die Probe befindet, fokussiert. Der Anregungsfilter BG3, direkt vor der LED befestigt, gewährleistet eine zusätzliche Einschränkung des Anregungsspektrums. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch zwei weitere Linsen auf eine Photodiode der Firma Laser Components fokussiert. Der Fluoreszenzfilter OG520 vor der Photodiode garantiert, dass ausschließlich Fluoreszenzlicht auf die Photodiode gelangt. Um Hintergrundlicht zu vermeiden, baute ich einen Schutz aus schwarzer Pappe bzw. Moosgummi um die ganze Anordnung.

Abb. 1) Messaufbau



Da kostengünstige Küvetten aus Kunststoff sind, baute ich eigene Küvetten aus Objektträgern. Die einzelnen Gläser klebte ich mit Dichtungssilikon aneinander. Eine Silizium Photodiode weist Polarisationseffekte auf, die die Messungen stören. Aus diesem Grund wurde hinter den Polarisationsfilter für das Fluoreszenzlicht eine sog. Lambda/4-Platte gelegt, die linear polarisiertes Licht in zirkular polarisiertes umwandelt. (Jahn, Lichte) Die gemessene Polarisation bei einer Aluminium-Folie als Probe wurde so auf 98 % gebracht.

Proben

Stammösungen von jeweils 1g/l Farbstoff (Rhodamin 6G, Acridin Orange, Fluorescein) in vergälltem Alkohol (96Vol%) wurden auf Vorrat angelegt. Da Fluorescein nur im alkalischen eine starke Fluoreszenz aufweist, wurden in diesem Fall 5 ml Ethanol mit 5 ml einer einmolaren NaOH - Lösung ersetzt.

Als mikroskopische Probe verwendete ich nach der Vorschrift für Acridin Orange Zinkchlorid Doppelsatz angefärbte Zwiebelzellen. (Merck KGaA)

Um das Funktionsprinzip des Aufbaus ohne Mikroskop zu testen, verwendete ich zunächst unterschiedliche Lösungsmittel wie Wasser oder Glycerin, das ich mit dem Farbstoff Fluorescein versetzte. Von Fluorescein in reinem Glycerin ist bekannt, dass es eine Polarisation von 0,4 aufweist. (Universität Jena)

Eine Polarisationsmessung in Abhängigkeit der Viskosität führte ich mit Acridin Orange in einer Zuckerlösung durch, bei der die Viskosität durch den Zuckergehalt eingestellt wurde.

Zur Bestimmung des Rotationsvolumens von DNA isolierte ich DNA aus Zwiebeln nach einer Vorschrift der Universität Frankfurt (M. Grahmann et al.) und färbte sie mit Acridin Orange.

Für die o.g. Probe SDS (Fa. Omikron GmbH) wurde der lipophile Farbstoff Rhodamin 6G Hydrochlorid (Fa. Baxter) verwendet.

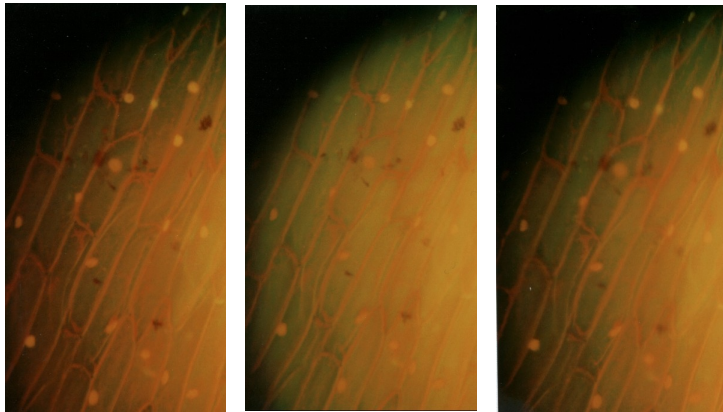
Ergebnisse

Verbesserung der optischen Qualität des Fluoreszenzmikroskops

Wie schon beschrieben, wollte ich durch polarisiertes Licht die Hintergrundstreuung im Fluoreszenzmikroskop verringern. Abbildung 2c) zeigt Zwiebelzellen, die aufgrund der inhomogenen Zellstruktur viel Streulicht aufweisen.

Abb. 2a) Zwiebelzellen im 10-er Objektiv ohne Polarisationsfilter

a) parallel b) senkrecht c) ohne Pol- Filter

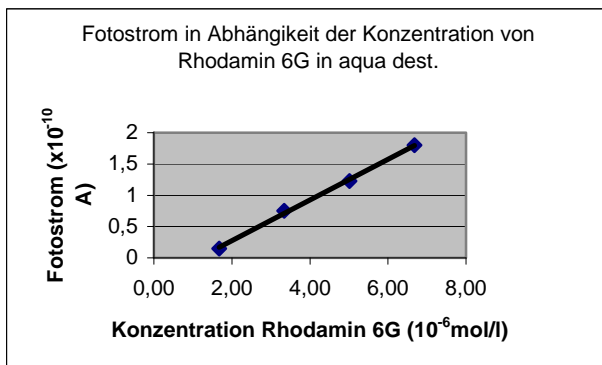


Der Kontrast konnte mit der parallelen Filterstellung etwas verbessert werden. In dieser Filterstellung kommt nur das Licht hindurch, das in der Zelle nicht gedreht oder depolarisiert wurde, also weniger Streulicht. Ebenso ist bei dieser Filterstellung eine leichte Rotverschiebung zu beobachten, was daran liegen kann, dass grünes Licht aufgrund der kleineren Wellenlänge mehr gestreut und deswegen mehr herausgefiltert wird.

Charakterisierung des Messaufbaus ohne Mikroskop

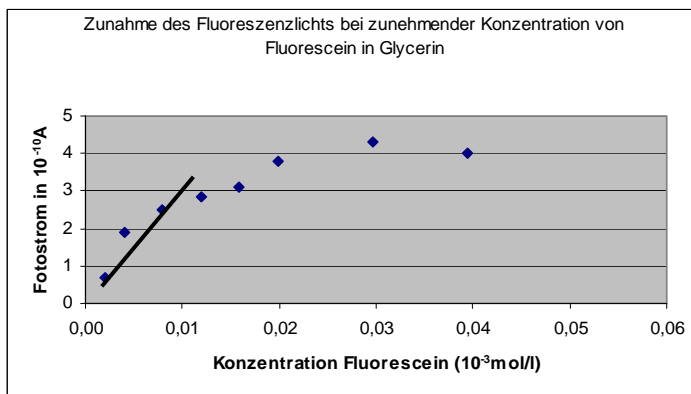
Polarisationsmessungen zur Ermittlung der chemischen Umgebung der Farbstoffe sind nur bis zu einer bestimmten Farbstoffkonzentration möglich. Darüber hinaus können Dimere vorkommen, bei denen sich sowohl das Absorptions- als auch das Fluoreszenzspektrum und die Fluoreszenzabklingzeit verändern kann. (Weber) Mit dem Farbstoff Rhodamin 6G in aqua dest. führte ich in Abhängigkeit der Konzentration des Farbstoffes Intensitätsmessungen des Fluoreszenzlichts durch, die gezeigt haben, dass die Intensität linear mit der Zunahme der Konzentration von Rhodamin 6G steigt, was die Voraussetzung für Polarisationsmessungen ist. Alle Messungen mit Ausnahme der Leitfähigkeitsmessungen finden bei Konzentrationen unterhalb der Dimerenbildung statt.

Diagramm 1) Linearer Anstieg des Fotostroms (ausgelöst nur durch Fluoreszenzlicht)



Die Messung der Fluoreszenzintensität von Fluorescein in Glycerin mit paralleler Polarisationsmessung zeigt den Effekt der Dimerenbildung auf Intensität und Anisotropie.

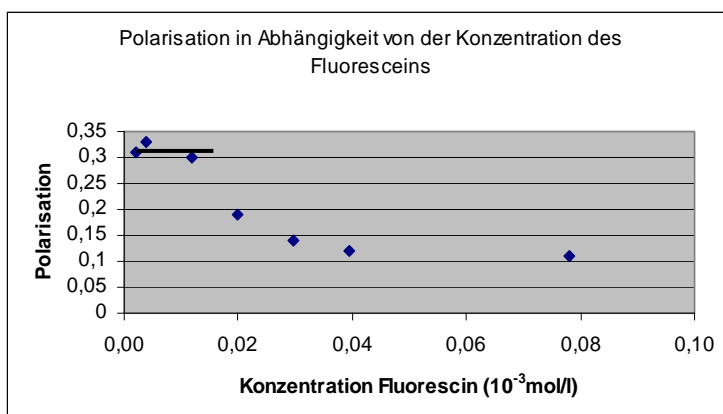
Diagramm 2) Fluoreszenzintensität bei steigender Konzentration



Das Diagramm zeigt die lineare Zunahme der Fluoreszenzintensität bis zu der Konzentration $c = 8 \times 10^{-6}$ mol/l, ab der die Konzentration des Farbstoffs eine Dimerenbildung ermöglicht.

Diese Grenze kann auch an der parallel ausgeführten Polarisationsmessung von Fluorescein in Glycerin gesehen werden (Diagramm 3), bei der die Polarisation ab der überschrittenen Grenzfarbstoffkonzentration von $c = 1,2 \times 10^{-5}$ g/l stark abnimmt, was mit der verlängerten Fluoreszenzlebensdauer der gebildeten Dimere zusammen hängt. Bis zu dieser Konzentration allerdings zeigt der Graph für Glycerin etwas niedrigere Werte im Vergleich zur Literatur, bei Abkühlung der Probe auf 9°C konnte der Wert von 0,4 gemessen werden. (Universität Jena)

Diagramm 3) Polarisationsmessung in Glycerin



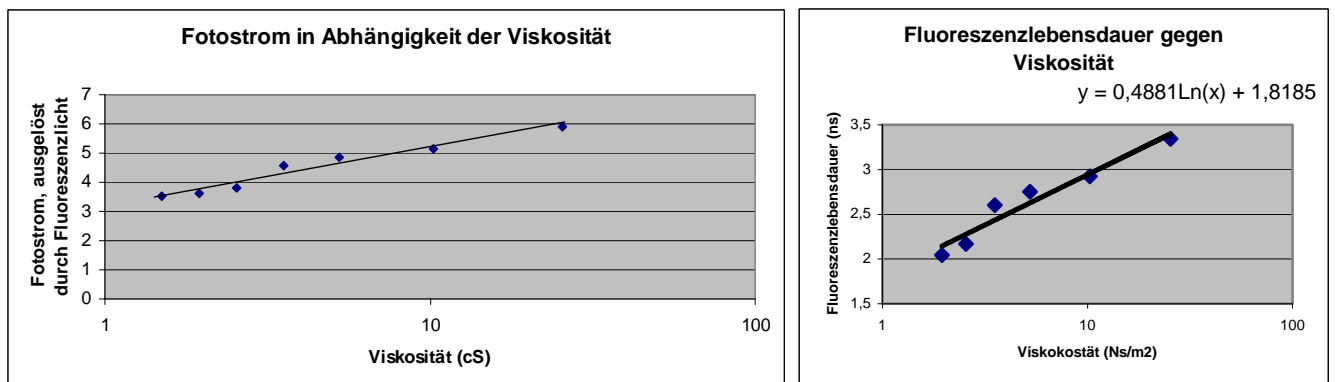
Bestimmung des Rotationsvolumens Acridin Orange

Das Rotationsvolumen von Acridin Orange habe ich mit Hilfe einer Zuckerlösung, deren Viskosität durch den Zuckergehalt variiert wurde, gemessen. Da Acridin Orange sich nicht in Zucker einlagert, ist die gemessene Fluoreszenz und Polarisation nur auf die AO – Moleküle zurückzuführen.

Mit zunehmender Viskosität ($1\text{cS} = 0,001\text{Ns/m}^2$) wurde ein Anstieg der Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts gemessen, was mit einer gehemmten Drehbewegung zu begründen ist. Das Rotationsvolumen lässt sich ermitteln, wenn man $1/A$ gegen V/η aufträgt. (Urbanke, Curth)

Erstaunlich war, dass auch die Intensität des Fluoreszenzlichts mit zunehmender Viskosität stieg. Eine mögliche Ursache ist die Verschiebung der Fluoreszenzbande von Acridin Orange in der Zuckerlösung. Ein Farbunterschied konnte mit dem Auge aber nicht erkannt werden.

Diagramm 6) Zunahme der Fluoreszenzintensität mit der Viskosität und errechnete Fluoreszenzlebensdauer



Der Grund für den Anstieg der Fluoreszenzintensität besteht vermutlich in der verlängerten Lebensdauer des angeregten Zustands in höheren Viskositäten. Dies wurde auch bei anderen Farbstoffen beobachtet. (Raikar et al) Bei Farbstoffen, die keine Quantenausbeute von 100 % aufweisen, ist die Fluoreszenz nur eine von verschiedenen Möglichkeiten der Energieabgabe, d. h. Relaxationsprozessen. Werden diese anderen Möglichkeiten, beispielsweise durch eine geringe Möglichkeit zur Rotation gehemmt, nimmt die Fluoreszenzintensität zu.

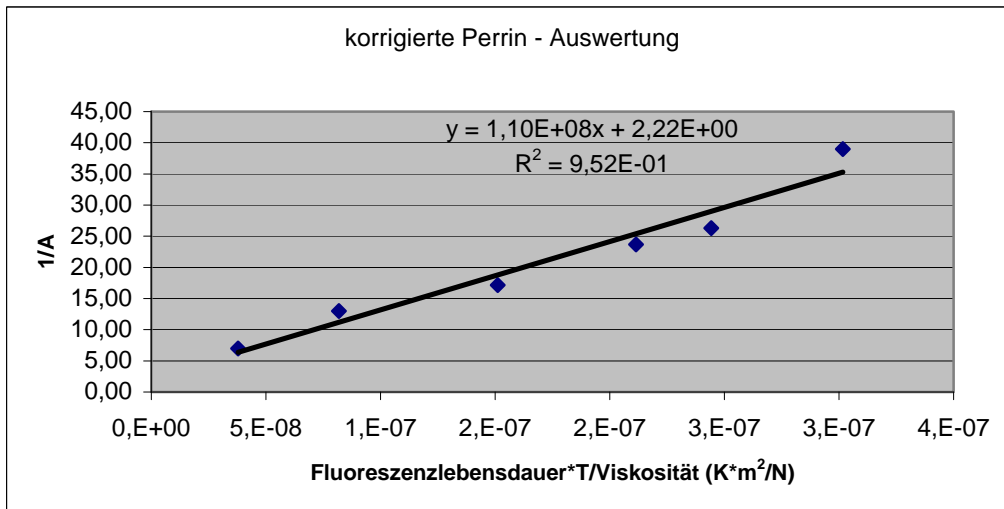
Bei Acridin Orange liegt die Fluoreszenzquantenausbeute bei 20% in Ethanol. (Scott Prahl) Die Fluoreszenz in Wasser liegt nach Handversuchen in einem ähnlichen Bereich, zumindest deutlich unter 100 %. Damit kann eine Abschätzung der steigenden Fluoreszenzlebensdauer erstellt werden. Die Fluoreszenz nimmt exponentiell mit der Zeit ab. Wenn die Gesamtintensität um den Faktor 1,7 gesteigert wird, bedeutet dies, dass das Integral unter der Fluoreszenz-Zeit Kurve um diesen Faktor zugenommen hat. Mit einer Fluoreszenzlebensdauer aus der Literatur von 2 ns (Shaw et al.) in Wasser kann damit die Fluoreszenzlebensdauer in anderen Viskositäten wie in Diagramm 6 dargestellt errechnet werden. In anderen Umgebungen höherer Viskosität, allerdings auch einer elektronischen Wechselwirkung von Farbstoff mit der Umgebung wie in DNA wurden Werte von 6 ns in der Literatur angegeben. (Shaw et al.)

Die Perrin-Gleichung zur Ermittlung der intrinsischen Anisotropie und des Rotationsvolumens

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{\tau_F k}{V} \cdot \frac{T}{\eta} \right)$$

Fluoreszenzlebensdauer. Daher habe ich eine korrigierte Version der Auswertung in Diagramm 7 gewählt, bei der die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer mit eingerechnet wird.

Diagramm 7) Ermittlung der intrinsischen Anisotropie A_0 und dem Rotationsvolumen V



Dadurch ergibt sich für die Steigung des Graphen $m = \frac{1}{A_0} \cdot \frac{k}{V} = 1,1 \times 10^5 \text{ N/ K}^2 \text{m}^2$. A_0 ist der extrapolierte y-Wert

des Graphen bei $\frac{\tau_F T}{\eta} = 0$. Das entspricht hier einer intrinsische Anisotropie von $A_0 = \frac{1}{2,2} = 0,45$, die leicht

oberhalb der möglichen Werte bis 0,4 liegt. Der eigentlich erwartete Wert liegt bei einem Dipol im angeregten Zustand parallel zum Grundzustand bei 0,4. (Universität Jena) Ohne die Berücksichtigung der Veränderung der Lebensdauer über die korrigierte Perrin-Gleichung würde sich ein Winkel von fast 40° zwischen den beiden Zuständen ergeben. Mit diesen Werten konnte für das Rotationsvolumen ein Wert von $3,1 \times 10^{-28} \text{ m}^3$ und damit unter der Näherung der Annahme einer Kugelform für Acridin Orange ein Durchmesser von 0,84 nm bestimmt werden. Dichtewerte von Acridin Orange konnten nicht gefunden werden. Als Vergleich kann das Volumen im Kristall für Acridin (Dichte von $1,005 \text{ g/cm}^3$ und Molgewicht von 179 g/mol) genommen werden. (Weast) Das

Volumen $V = \frac{m}{\delta}$ für ein einzelnes Acridin-Molekül ist damit $2,96 \times 10^{-28} \text{ m}^3$; das entspricht einem Durchmesser einer angenommenen Kugel von 0,83 nm.

Bestimmung der Mikroviskosität von DNA durch Acridin Orange

DNA besteht aus sehr langkettigen Molekülen, die sich in Lösung nur langsam drehen können. Farbstoffe wie Acridin Orange oder Ethidium Bromid, die in die DNA – Struktur interkalieren, das heißt sich fest darin einlagern, sind in ihrer Bewegung auch an die Viskosität in der α - Helix gebunden.

Wenn sich Acridin Orange in DNA einlagert, kann die Viskosität der DNA unter der Annahme des gleichen hydrodynamischen Rotationsvolumens von Acridin Orange in DNA wie in der wässrigen Lösung abgeschätzt werden.

Tab. 2) Berechnung des Mikroviskosität von DNA mittels Acridin Orange

	Fotostrom ohne Polarisationsfilter ($\times 10^{-10}$ A)	Polarisation	Anisotropie	Viskosität Lösung (Ns/m ²)	Viskosität DNA (Ns/m ²)
DNA gelöst in TE-Puffer	0,63	Nicht Messbar	Nicht Messbar		
+ Acridin Orange	4,32	0,107	0,074	1×10^{-3}	2×10^{-2}
Überführung in 28 %-ige Zuckerlösung	2,43	0,146	0,102	$2,55 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$

Um die Viskosität der DNA in der Lösung zu bestimmen, verwendete ich wieder obige Formel:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{\tau_F k}{V} \cdot \frac{T}{\eta} \right), \text{ wobei } A_0 = 0,4 \text{ sich bei der Interkalation nicht wesentlich geändert haben dürfte, da}$$

die Anregung nur im Acridin Orange Molekül stattfindet. Für die Fluoreszenzlebensdauer gilt für Acridin Orange in DNA $\tau = 6,1$ ns. (Shaw et al.) Die Viskosität von der DNA – Wasserlösung ist der von Wasser gleichzusetzen: $\eta = 1 \times 10^{-3}$ Ns/m²; nach Überführung in die 28%-ige Zuckerlösung beträgt $\eta = 2,554 \times 10^{-3}$ Ns/m² (Robert Weast). Die Viskosität der Lösung ändert sich um den Faktor 2,5, die Mikroviskosität aus den Polarisationsdaten nur um etwa die Hälfte dieses Wertes. Die Polarisation von Acridin Orange war in den verwendeten Konzentrationen nicht abhängig von der Konzentration des Farbstoffs, d. h. der Farbstoff sollte vollständig in die DNA eingelagert sein. Anscheinend ist die Mikroviskosität von der Viskosität der Lösung abhängig, d. h. die Rotation des Komplexes Acridin Orange / DNA ist teilweise für die Depolarisation verantwortlich, nicht nur die Rotation des Farbstoffs.

Messung der kritischen Konzentration von SDS zur Micellen - Bildung

Zur Messung der CMC wurden Fluoreszenzintensität und Polarisation in Abhängigkeit von der Konzentration an SDS in aqua. dest. gemessen, wobei sich Rhodamin 6G an die unpolaren Teile des SDS anlagert. (TU Berlin, Dern)

Diagramm 8) Messung der Fluoreszenzintensität und der Polarisation von Rhodamin 6G in Wasser mit SDS

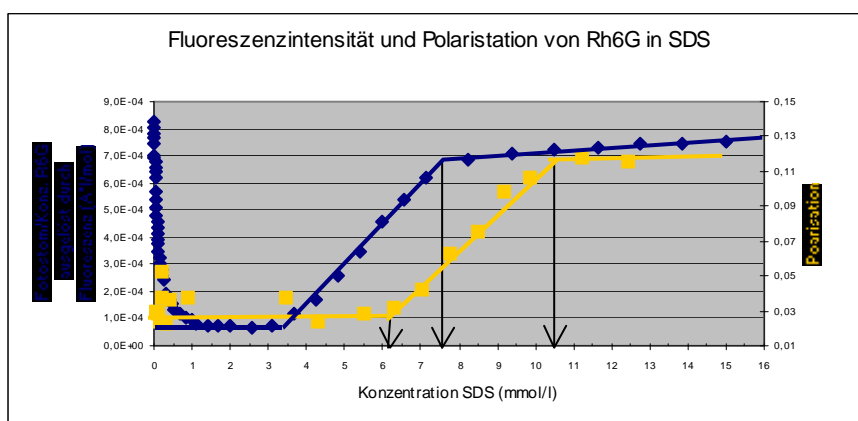
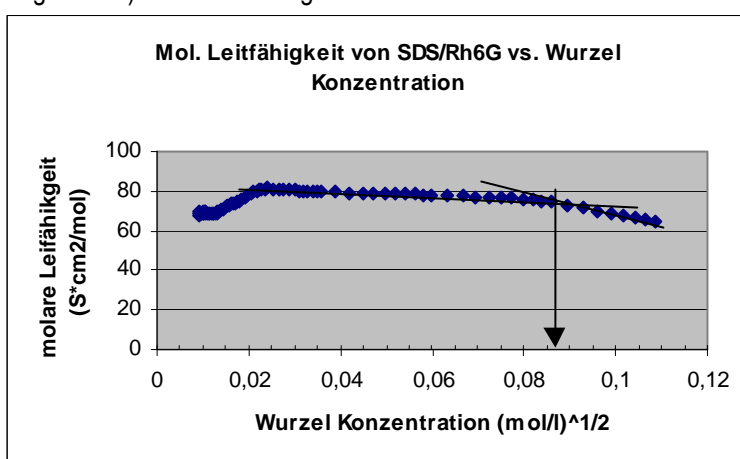


Diagramm 8) zeigt zunächst den Abfall der Fluoreszenzintensität (Konzentration Rhodamin 6G = $6,96 \times 10^{-6}$ mol/l) bei zunehmender Konzentration an SDS. Dies war zunächst erschreckend, da ich keine Änderung der Intensität erwartete. Dieser Abfall der Fluoreszenzintensität konnte ich nachträglich auch in der Literatur finden (Vendittis). Anscheinend bildet Rhodamin 6G zunächst eine Verbindung mit SDS aus, die die Fluoreszenz quencht. Die Messung der Polarisierung im Bereich der sehr niedrigen Fluoreszenzintensität erwies sich als sehr schwierig. Mit zunehmender Konzentration von SDS nimmt die quenchende Wirkung von SDS ab; bei noch höheren Konzentrationen nimmt auch die Polarisierung wieder zu. Bei der CMC lagern sich viele SDS-Moleküle zu größeren Komplexen zusammen, in welchen der Farbstoff seine Beweglichkeit verliert. Dass das Rhodamin 6G in einer anderen Umgebung als ursprünglich vorkommt, kann auch daran gesehen werden, dass die ursprüngliche Fluoreszenzintensität nur zu 75 % nach Sättigung im Polarisationswert erreicht wird, dieser Wert steigt allerdings bei steigender SDS-Zugabe. Die gleiche Form der Kurven ergibt sich bei Verwendung von isotonischer Kochsalzlösung statt Wasser, nur dass hier die gleichen Effekte bei geringerer SDS Konzentration beobachtet werden, d. h. der Anstieg der Fluoreszenz erfolgte ab einem Wert von $C_{\text{SDS}} = 0,8$ mmol/l. Gemäß der Auswertung aus der Literatur liegt die CMC beim Anstieg der Polarisierung (Thorsteinsson), wonach sie hier bei 6,6 mmol/l liegen würde.

Um die CMC mit einer anderen Methode nachzuweisen, habe ich Leitfähigkeitsmessungen von SDS in Wasser und von Rhodamin 6G ($c = 8 \times 10^{-5}$ mol/l) und SDS in Wasser durchgeführt (Diagramm 9). Zur Bestimmung der CMC wird die molare Leitfähigkeit $\lambda = \kappa / c$ (κ ist die Leitfähigkeit in S/m; c die Konzentration (Terhorst)) gegen die Wurzel der Konzentration aufgetragen und der Abfall der Steigung der molaren Leitfähigkeit bestimmt. (Mialocq et al.) Die CMC liegt bei 8,5 mmol/l SDS, was mit einer Vergleichsmessung von SDS ohne Rhodamin 6G bestätigt werden konnte. Aus der Literatur ist die CMC für SDS finden sich in reinem Wasser Werte von 8,0 bis 8,3 mmol/l. (Thorsteinsson) Damit ergibt sich für die Messung der Fluoreszenzpolarisierung ein zu niedriger Wert für die Ablesung nach Thorsteinsson.

Diagramm 9) Molare Leitfähigkeit von Rhodamin 6G und SDS in Wasser gegen die Wurzel der Konzentration

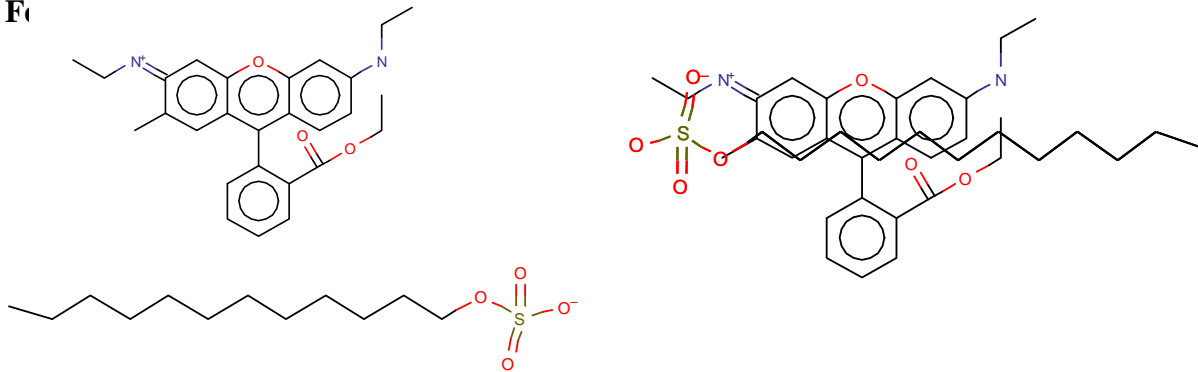


Die molare Leitfähigkeit nimmt bei niedrigen Konzentrationen SDS erst ab und steigt ab einer Konzentration von 0,13 mmol/l SDS. Der erstmalige Abfall der molaren Leitfähigkeit zeigt an, dass sich Moleküle mit unterschiedlicher Ladung zusammenfügen und in diesem nach außen hin neutralen Zustand keinen Beitrag mehr zur Leitfähigkeit liefern können. Der Wiederanstieg der molaren Leitfähigkeit kann dadurch begründet werden,

dass weitere SDS-Moleküle hinzukommen, die nicht mehr durch Rhodamin 6G-Moleküle neutralisiert werden. In diesem Bereich ist die Konzentration des Farbstoffs und des SDS in etwa gleich (0,08 zu 0,1 mmol/l). Sowohl in den Messungen der Fluoreszenz, als auch bei den Leitfähigkeitsmessungen wurde ein Zusammenschluss zwischen SDS und Rhodamin 6G beobachtet, der die Fluoreszenz quencht.

Abb. 5) Struktur von Rhodamin 6G und dem Dodecylsulfonsäureanion (ChemAxon) und einer vorgeschlagenen Struktur des Komplexes zwischen beiden.

F1



Das Rhodamin 6G hat aufgrund seiner positiven Ladung und den Benzolringen ein delokalisiertes Elektronensystem. Während in Abb. 5 die positive Ladung auf der linken Seite gezeichnet wurde, kann sie unter Umlagerung der Elektronenbindungen auch auf der rechten Seite angenommen werden. An dieser positiven Ladung kann die negative Ladung des SDS zum SDS/Rhodamin 6G -Komplex andocken.

Das Rhodamin 6G als fettlöslicher Farbstoff und die organische Kette des SDS können gut miteinander wechselwirken. Von Vorteil ist zusätzlich, dass sich die negative Ladung des SDS beim vorgeschlagenen Komplex an die positive Ladung des Rhodamin 6G anlagern kann. Dadurch wird aber das bisher delokalisierte Pi-Elektronensystem des Farbstoffs gestört, das heißt die Ladung ist auf einer Seite fixiert. Offensichtlich ändert sich durch diesen zusätzlichen Dipol die Elektronendichte des Moleküls im Grund- oder angeregten Zustand so stark, dass die Fluoreszenzquantenausbeute stark abnimmt. So quenchen auch zugegebene Laugen in einem pH-Bereich > 12 die Fluoreszenz von Rhodamin 6G.

Kommen weitere SDS-Moleküle hinzu, so kann sich auch das andere Stickstoffatom an eine Sulfatgruppe anlagern und die Elektronenverteilung des Moleküls wird nach diesem Modell wieder in einen symmetrischen Zustand versetzt.

Um herauszufinden, ob die Fluoreszenz- quenchende Verbindung zwischen Rhodamin 6G und SDS einer definierten chemischen Reaktion zuzuschreiben ist, die sowohl für den Effekt des Fluoreszenzquenchens also auch für den der Leitfähigkeitsmessung verantwortlich ist, errechnete ich die Gleichgewichtskonstante K aus den Werten der Konzentration des freien bzw. gebundenen Farbstoffs in Abhängigkeit der Konzentration von SDS. Die Werte für die Konzentration des freien Farbstoffes errechnete ich aus der abnehmenden Fluoreszenzintensität (dies ist möglich, da Rhodamin 6G eine sehr hohe Quantenausbeute von 95% aufweist) (Wunschhofer) und aus der Leitfähigkeitsmessung. Bei der Berechnung über die Fluoreszenzintensität gilt ein Wert von $5 \text{ mA}^*/\text{mol}$ für die Gesamtkonzentration c_0 von Rhodamin 6G, die ohne Zugabe von SDS nur freien Molekülen Farbstoff entspricht, wohingegen der minimale Fotostrom von $0,5 \text{ mA}^*/\text{mol}$ einer Konzentration des

freien Farbstoffs von 0 entspricht (unter der Annahme, dass dort alle Farbstoffmoleküle gebunden sind). Die Konzentration des gebundenen Farbstoffes ist entsprechend die Differenz zwischen der Gesamtkonzentration und die des freien Farbstoffs.

Für die Leitfähigkeitsmessungen kristallisierte ich den ersten Komplex in einer Alkohol-Wasser-Mischung (1:1) über 10 Tage bei -18°C aus und bestimmte aus einer Auftragung der molaren Leitfähigkeit gegen die Wurzel der

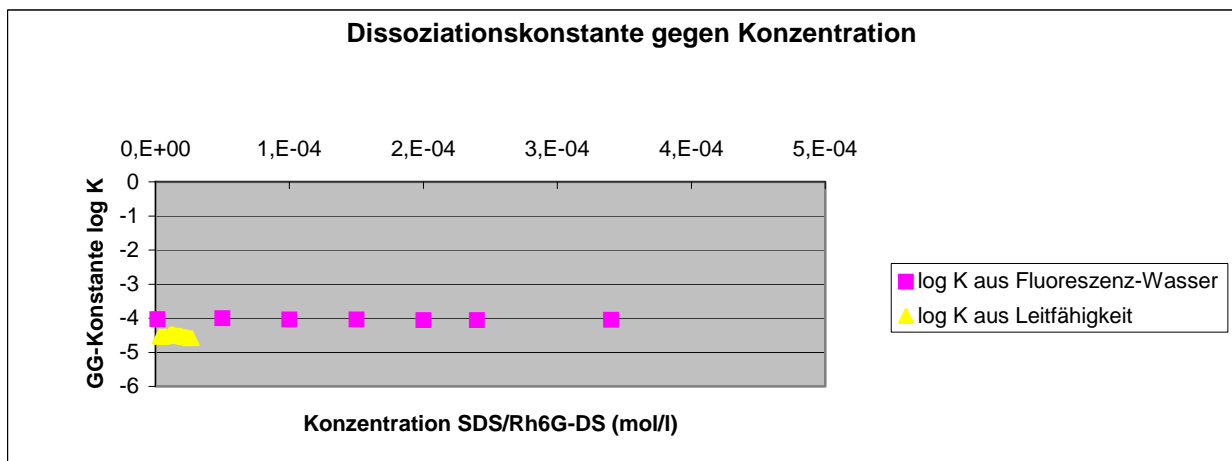
Konzentration die Grenzleitfähigkeit λ_0 , womit sich über die Formel $K = \frac{\lambda^2 \cdot c}{\lambda_0(\lambda_0 - \lambda)}$ für den Bereich niedriger

SDS-Konzentrationen die Gleichgewichtskonstante K der Bildung des Komplex 1 (SDS + Rhodamin 6G \rightleftharpoons [SDS/Rhodamin 6G]) errechnen lässt.

Dies ist nur möglich, wenn tatsächlich definierte Reaktion zwischen den beiden Stoffen in Lösung angegeben werden kann. Als Formel für die Berechnung aus der Fluoreszenzintensität lässt sich die genannte Reaktion folgendermaßen beschreiben:

$$K = \frac{c_{\text{gebundenerFarbstoff}}}{c_{\text{SDS}} \cdot c_{\text{freierFarbstoff}}}$$

Diagramm 9) Gleichgewichtskonstante K in l/mol bei verschiedenen Konzentrationen an SDS



Aus der Gleichgewichtskonstanten kann die freie Standardenthalpie ΔG° bestimmt werden, deren Vorzeichen die Reaktionsrichtung unter Standardbedingungen anzeigt. (Wikipedia 2)

Aus $\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \cdot \ln K$ (ΔG : freie Enthalpie; R: universelle Gaskonstante) wird wegen $\Delta G = 0$ (Gleichgewichtsbedingung) $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K = -22 \text{ kJ/mol}$ (aus Fluoreszenzabfall) und -24 kJ/mol aus Leitfähigkeitsmessungen für die oben genannte Reaktion.

Die Größenordnung ist für Anlagerungen ionischer Partner in Lösung im Rahmen der Werte in der Literatur. (Shen) Bei einer wieder erhöhten Konzentration von SDS finden weitere Reaktionen statt, die nur schwer zu trennen sind. Aus der erneuten Zunahme der Fluoreszenz kann eine freie Standardenthalpie von ca. -18 kJ/mol für die Reaktion $[\text{SDS/Rhodamin 6G}] + \text{SDS} \rightleftharpoons [\text{2SDS/Rhodamin 6G}]$ (Komplex 2) abgeschätzt werden. Dieser Wert errechnet sich unter der Annahme, dass der zweite Komplex aus einem Farbstoffmolekül und zwei SDS Molekülen gebildet wird (diese Annahme ist aufgrund der steigenden Konzentration an SDS gewählt, muss aber

nicht stimmen). Da auch bei hohen SDS-Konzentrationen nur 75 % der Fluoreszenzintensität des Anfangswertes vorliegen (s. Diagramm 8), ist der Farbstoff hier in einer anderen Form eingelagert.

Von dem auskristallisiertem ersten Komplex konnte mit Hilfe des des JuFo-Jurors Dr. Gebert (Wacker Chemie) NMR-Spektren in DMSO aufgenommen werden, woraus aus dem CH_2 Peaks des Dodecylsulfat zu den CH_3 Peaks am Aromaten von Rhodamin 6G ein Verhältnis von 1,01:1 ergab. Die Peaks der Wasserstoffatome und der CH_3 -Gruppen am Acridinkörper zeigen im Komplex zudem eine Verbreiterung. An dem Benzolring sowie an der CH_3 -Gruppe am Ester sind keine Verschiebungen zu erkennen.

Diskussion

Allgemein kann gesagt werden, dass der Aufbau zur Messung der Fluoreszenzanisotropie von verschiedenen Proben gelungen ist. Ebenso korrelierten die Messungen der die CMC von SDS in Wasser sowohl mit der Literatur, als auch mit den Leitfähigkeitsmessungen.

Bei der Veränderung der Viskositäten konnte mit den aus der Zunahme der Fluoreszenzintensität ermittelten Werten und einem aus der Literatur stammenden Anfangswert die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden. Die so erhaltenen Daten sind deutlich plausibler als ohne Korrektur. Eine direkte Messung der Fluoreszenzlebensdauer würde die Auswertung abrunden. Das ermittelte Rotationsvolumen von Acridin Orange lag nahe an der Molekülgröße von Acridin Orange. Dies ist plausibel, da das Molekül nicht wie im Falle der DNA – Messung in einen anderen Stoff eingelagert ist. Eine intrinsische Anisotropie von 0,4 zeigt an, dass die Dipole des angeregten Zustands parallel zum Grundzustand liegen.

Die Daten habe ich verwendet, um die Mikroviskosität von DNA in TE-Puffer zu ermitteln. Die Größenordnung der Viskosität stimmt mit den Daten der Mikroviskosität in Zellen überein. (Yamada) Mit dieser Methode könnten auch die Veränderung der Mikroviskosität in lebenden Zellen z. B. in Krebszellen, bei denen die DNA deutlich aktiver als in gesunden Zellen ist, untersucht werden. Ggf. können auch auf diese Weise bei einer Operation gesunde von kranken Zellen unterschieden werden.

Bei der Messung der Polarisierung von Fluorescein in Glycerin habe ich einen Wert von 0,35 gemessen, während Literaturangaben bei 0,4 lagen. (Universität Jena) Dies kann daran liegen, dass das Glycerin aus der Apotheke etwas Wasser enthielt. Sehr kleine Mengen an Wasser reichen aus, um die Viskosität zu verringern. (Weast)

Die Beschreibung der Reaktionen von SDS mit Rhodamin 6G ergab bei der ersten, Fluoreszenz - quencheden Reaktion zum Komplex 1 sehr gute Werte von K und ΔG° . Dies bezieht sich sowohl auf die Berechnung über die Abnahme der Fluoreszenz, als auch über die Veränderung der Leitfähigkeit. Bei den Leitfähigkeitsmessungen ist die Annahme der Grenzleitfähigkeit für die Bestimmung des Dissoziationsgrades sehr kritisch, die Messungen bei den sehr geringen Leitfähigkeiten im Bereich von $\mu\text{S}/\text{cm}$ erfordern hohe Sorgfalt. Dass ein 1:1 – Komplex gebildet wird, konnte auch durch das NMR-Spektrum bestätigt werden. Die Verbreiterung der NMR-Peaks spricht zudem für eine Anlagerung des SDS an den Acridinkörper des Rhodamin 6G auch im polaren Lösungsmittel DMSO.

Beim 2. Komplex war es schwieriger, da hier vermutlich eine kontinuierliche Anlagerung von SDS Molekülen an den Komplex 1 bis zur Micellenbildung statt findet. Dennoch kann aufgrund der eindeutig früheren Steigung der

Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Steigung der Polarisierung gesagt werden, dass es sich um mindestens drei – ggf. in einander übergehende - verschiedene Reaktionsschritte bezogen auf die Einlagerung von Rhodamin 6G in SDS handelt.

Aus der Zunahme der Polarisierung kurz nach der Fluoreszenzzunahme kann eine dritte Reaktion vom Komplex 2 mit SDS abgeleitet werden, die wahrscheinlich eine Vorstufe der Micellenbildung darstellt. Damit fungiert Rhodamin 6G als Kristallisationskern für die Anlagerung von SDS auch bei höheren Konzentrationen.

Mit einem Photometer habe ich die Extinktion des Farbstoffs bei 492 nm in Abhängigkeit von der SDS – Konzentration gemessen. Die Werte zeigen eine sehr komplexe Abhängigkeit, insbesondere bei geringen SDS – Konzentrationen. Weitere Messungen mit einem Absorptionsspektrometer sind zusammen mit der Messung der wellenlängenaufgelösten Fluoreszenz notwendig und können Hinweise auf die Anlagerung von SDS-Molekülen im Bereich der CMC geben.

Die CMC kann nach Thorsteinsson an der Steigung der Fluoreszenzpolarisierung abgelesen werden, wobei hier auch ein anderer Farbstoff verwendet wurde. Im Vergleich zur Leitfähigkeitsmessung wäre dieser Wert mit 6,6 mmol/l allerdings zu niedrig, sodass sein könnte, dass das Maximum der Fluoreszenzintensität ein Maß für die CMC darstellt ($c = 7,8$ mmol/l). Bei den Polarisierungswerten fällt auf, dass der Mittelwert zwischen Anfang des Anstiegs und dem Endwert mit 8,3 mmol/l SDS Konzentration mit der CMC aus den Leitfähigkeitsmessungen übereinstimmt.

Weitere Messungen mit SDS wären sehr interessant, wie zum Beispiel die Temperaturabhängigkeit (Messung der Reaktionsentropie) und die weitere Charakterisierung der stattfindenden Reaktionen.

Mit diesem Fluoreszenzpolarisierungsmessgerät steht ein gutes Instrument zur Messung von chemischen Prozessen in biologischen Proben zur Verfügung. Damit kann auch die Auswirkung von Stress auf Bakterienmembranen oder die Stabilität von biologischen Membranen charakterisiert werden. (Mykytczuk) Die Prozesse werden dabei komplexer, so dass unterschiedliche biologische, chemische und physikalische Methoden zum Einsatz kommen müssen, um eindeutige Aussagen treffen zu können.

Literaturverzeichnis

1. Bigelow, C. E.: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.0022-2720.2004.01357.x>, 11.03.08
2. ChemAxon: <http://www.chemaxon.com/product/msketch.html>, 11.03.08
3. Dern, T.: http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=964441276&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=964441276.pdf, 11.03.08
4. Eimer, W. et al.: <http://www.stanford.edu/group/boxer/papers/paper69.pdf>, 11.03.08
5. Grahmann, M.: http://www.uni-frankfurt.de/fb/fb15/institute/didaktik-biowiss/_dokumente/Molekularbiologie.pdf, 11.03.08
6. Hoyer, M.: Fluoreszenz im Durchlichtmikroskop, Jugend Forscht Wettbewerb Bayern 2006
7. Jahn, L.; Lichte, W.: <http://www.physik.tu-dresden.de/praktikum/gnp/Anleitungen/PO.pdf>, 11.03.08
8. Jellen, Claus P.: http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=965344274&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=965344274.pdf, 11.03.08
9. Merck KGaA: <http://www.thyrolink.com/servlet/PB/show/1289130/115931de.pdf>, 11.03.08
10. Mialocq, J. C. et al.: Photophysical and photochemical properties of rhodamine 6G in alcoholic and aqueous sodium dodecylsulphate micellar solutions, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 56, 332-338 (1991)
11. Mykytczuk, N.C.S. et al: Fluorescence polarization in studies of bacteria cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress; *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2007; 95: 60-82
12. Prah, S.: <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/acridineorange.html>, 11.03.08
13. Prah, S.: <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/fluorescein-dibase.html>, 11.03.08
14. Rübiger, N.: <http://wasser-wissen.de/abwasserlexikon/k/kritischemizellkonzentration.htm>, 11.03.08
15. Raikar, U. S. et al. Steady state time resolved fluorescence polarization behaviour and determination of dipole moments of coumarin laser dye; *Journal of Molecular Structure* 787 (2006), 127-130
16. Shaw, A. K. et al.: http://www.bose.res.in/~skpal/papers/AO_DNA_RM.pdf, 11.03.08
17. Shen, H. et al.: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/jpcb/1997/101/i24/abs/jp970105x.html>, 11.03.08
18. Stanislaus, J. B.: http://www.chemie.uni-bayreuth.de/pcii/de/forschung/gru/html.php?id_obj=28042, 11.03.08
19. Terhorst, C.: http://www.qslnet.de/member/dk2yct/Bericht_Kohlrausches_Quadratwurzelgesetz.pdf, 13.03.08
20. Thorsteinsson, Marc V et al.: 5-Dodecanoylamino fluorescein as a probe for the determination of critical micelle concentration of detergents using fluorescence anisotropy. *Analytical Biochemistry* 2005; 340: 220 - 225
21. Universität Jena: http://www.ipc.uni-jena.de/download/pr_phchsp_fluoreszenzpolarisation.pdf, 11.03.08
22. Urbanke, C.; Curth, U.: <http://www.bpc.mh-hannover.de/curth/scripte/resonant.pdf>, 11.03.08
23. Vendittis, E. et al.: A Fluorimetric Method for the Estimation of the CMC of Surfactants, *Analytical Biochemistry* 115, 278-286 (1981)
24. Weast, Robert C.: CRC Handbook of Chemistry and Physics, Florida, 1987
25. Weber, J.C: http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=975868527&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=975868527.pdf, 13.03.08
26. Wikipedia1: http://de.wikipedia.org/wiki/Gibbs_Energie, 11.03.08
27. Wikipedia2: <http://de.wikipedia.org/wiki/Natriumlaurylsulfat>, 15.03.08
28. Wunschhofer, J.: <http://de.wikipedia.org/wiki/Rhodamine>, 11.03.08
29. Yamada, S. et al. Mechanics of Living Cells Measured by Laser Tracking Microrheology; *Biophys J*, April 2000, p. 1736-1747, Vol. 78, No. 4