

Universität Leipzig

Biophysik-Praktikum

Versuch: Energie-Transfer in dünnen Schichten

Institut für Experimentelle Physik I
Abt. Physik der weichen Materie
Prof. Dr. J. A. Käs
Linnéstr. 5, D-04103 Leipzig

Betreuer: Undine Dietrich, Tel. 97-32472
Wintersemester 2009/10

1 Einleitung

Mit Hilfe einer von Langmuir und Blodgett entwickelten Technik können Funktionseinheiten molekularer Größe aufgebaut werden. Dazu erzeugt man auf einer Wasseroberfläche eine monomolekulare Schicht aus amphiphilen Molekülen und überträgt diese dann auf ein Festkörpersubstrat. Auf diese Art lassen sich Multischichten aufbauen, die auch aus verschiedenen Substanzen bestehen können, sodaß man die physikalischen Eigenschaften eines solchen Mehrlagensystems gezielt beeinflussen kann.

In diesem Praktikumsversuch soll die Abstandsabhängigkeit des Förster-Perrinschen Energietransfers von einem Donor- an ein Akzeptormolekül untersucht werden. Dazu wird ein Schichtsystem aus Cyaninfarbstoffen, die durch aliphatische Ketten amphiphil gemacht wurden, und Fettsäuren hergestellt, wie in Abbildung 1.1 gezeigt. Es wird die Fluoreszenzintensität des Donors bei verschiedenen Abständen des Akzeptors ermittelt, wobei der Abstand durch die Anzahl der Fettsäureschichten variiert.

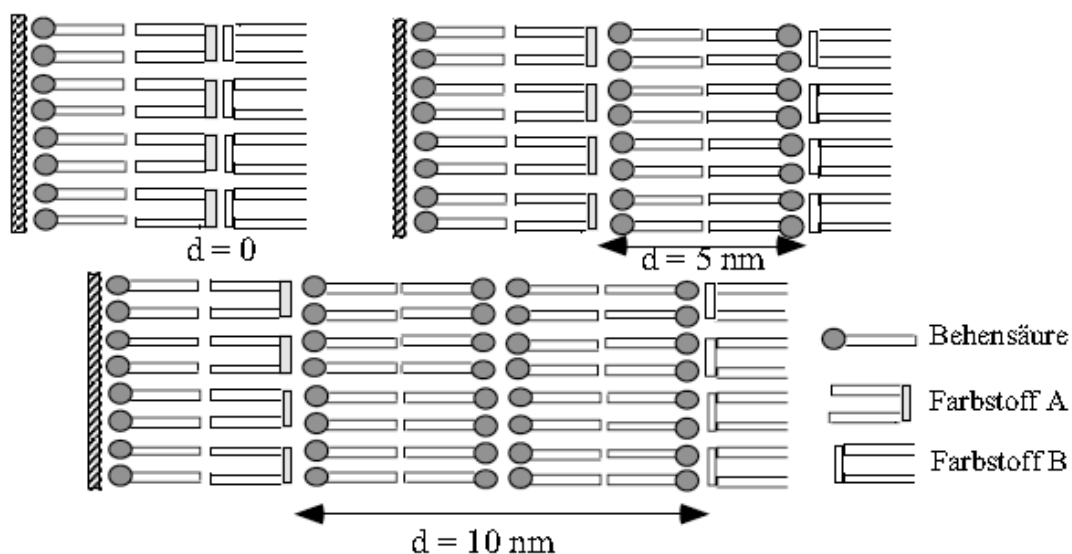


Abb. 1.1 Bauschema von Schichtsystemen mit verschiedenem Abstand d zur Messung des Energietransfers von D nach A

In dieser Anleitung werden die theoretischen Grundlagen des Förster-Perrinschen Energietransfers, die Filmwaagenteknik sowie die Herstellung von LB-

Multischichten beschrieben. Anschließend folgt die genaue Aufgabenstellung und eine Anleitung zur praktischen Durchführung des Versuchs.

Machen Sie sich bitte selbst Gedanken zu folgenden Stichpunkten:

- Energie-Transfer: Dipolmoment, Übergangsdipolmoment, Absorptions/Fluoreszenzspektroskopie, Einsteinkoeffizienten, Jablonski-Termschema, Frank-Condon-Faktoren etc.
- LB-Technik: Oberflächenspannung, Amphiphile, p-V-Diagramm (Isothermen), zweidimensionales Gas, etc.

2 Grundlagen

2.1 Monoschichten auf der Wasseroberfläche

Moleküle, die aus einem hydrophilen Teil (meist einer geladenen oder polaren Kopfgruppe) und einem hydrophoben Teil (eine oder mehrere aliphatische Kohlenwasserstoffketten) bestehen, werden als Amphiphile bezeichnet. Bei hinreichend großer Kettenlänge (mehr als 14 C-Atome) ist die Wasserlöslichkeit solcher Substanzen zu vernachlässigen. Löst man solche Moleküle in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel (z.B. Chloroform) und gibt einen Tropfen dieser Flüssigkeit auf eine Wasseroberfläche, so bilden die Amphiphile spontan eine monomolekulare Schicht. Diese Monoschicht reduziert die Oberflächenspannung γ_0 des Wassers (bei RT ist $\gamma_0 \sim 72.4 \text{ mN/m}$) um einen Betrag, der nicht einfach proportional zur Flächendichte der Moleküle ist, sondern in charakteristischer Weise vom Phasenzustand der Schicht abhängt. Die Differenz der Oberflächenspannung γ der filmbedeckten Oberfläche zur Oberflächenspannung γ_0 des reinen Wassers gegen Luft wird als Lateraldruck π bezeichnet:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.1.1)$$

Trägt man bei konstanter Temperatur den Lateraldruck gegen die molekulare Fläche A auf, so erhält man eine Isotherme analog zu den pV-Diagrammen dreidimensionaler Systeme.

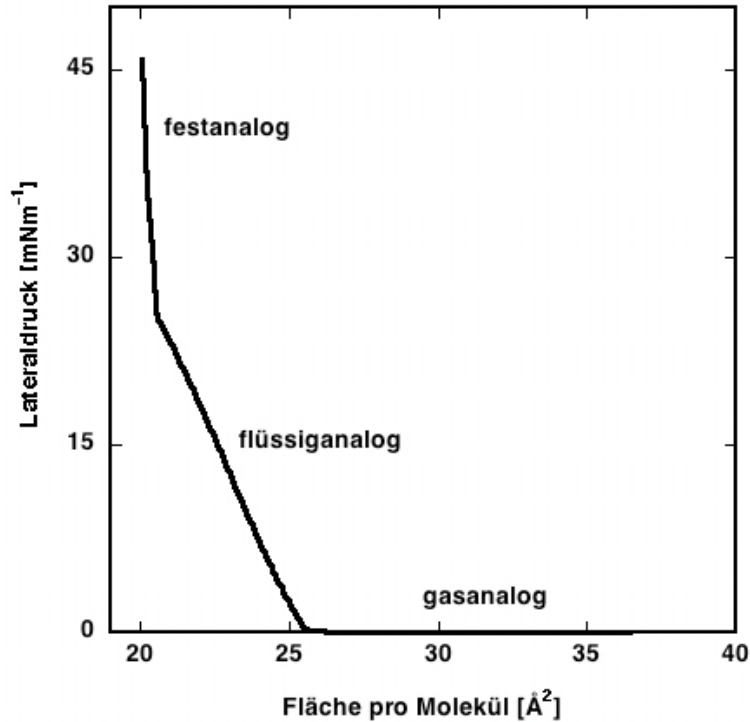


Abb. 2.1 Schematisches π -A-Diagramm einer Monoschicht

Den Bereichen mit unterschiedlicher Steigung der Isothermen kann man verschiedene Phasenzustände zuordnen. So unterscheidet man grob zwischen einer gasanalogen, einer flüssiganalogen und einer festanalogen Phase (siehe Abb. 2.1). Knicke und Gebiete mit Steigung Null in der Isotherme bedeuten eine Unstetigkeit bzw. Divergenz der Kompressibilität und sind somit ein Hinweis auf einen Phasenübergang in der Monoschicht. Die Kompressibilität ist definiert als:

$$\kappa = -\frac{1}{A} \frac{\delta A}{\delta \pi} \quad (2.1.2)$$

2.2 Die Filmwaage

Eine Filmwaage besteht im wesentlichen aus einem Teflontrog, beweglichen Teflonbarrieren, mit deren Hilfe die Oberfläche in ihrer Größe verändert werden kann, und einem Meßsystem für den Lateraldruck (Abb. 2.2). Üblicherweise wird der Druck durch ein Wilhelmy-System gemessen. Dabei wird die Kraft gemessen, mit der ein Blättchen Filterpapier, das leicht in die Subphase eintaucht, nach unten gezogen wird. Diese Kraft ist proportional zur Oberflächenspannung. Die nötige Gegenkraft wird durch eine Feder erzeugt (früher wurde die Gegenkraft mit Gewichten an einer Balkenwaage erzeugt, daher der Name "Filmwaage").

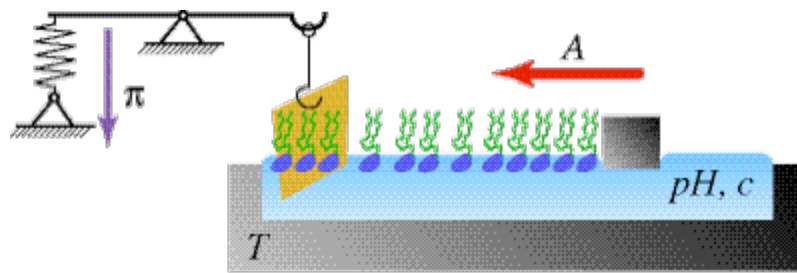


Abb. 2.2 Schema einer Filmwaage mit Wilhelmy-Druckmesssystem

2.3 Aufbau von Multischichtsystemen mit der LB-Technik

Bei der von Langmuir und Blodgett entwickelten Technik taucht man ein festes Substrat (z.B. ein gereinigtes Glasplättchen, s. Abb.2.3) langsam senkrecht durch eine auf einer Wasseroberfläche befindliche Monoschicht aus amphiphilen Molekülen. Durch mehrmaliges ein- und austauschen lassen sich so (zumindest prinzipiell) beliebig viele Schichten übereinanderlegen. Es ist zu beachten, daß auf einen hydrophilen Träger die erste Schicht beim Austauchen aufzieht, und der Träger anschließend hydrophob ist. Bei einem hydrophoben Träger lassen sich immer nur Doppelschichten übertragen, da hier auch beim Eintauchen ein Film aufzieht. Dieses Vorgehen ist schematisch in Abb. 2.4 dargestellt. Systeme, bei denen die hydrophilen Kopfgruppen der letzten Schicht nach außen zeigen, sind in der Regel nicht stabil, d.h. sie müssen stets unter Wasser gehalten werden. Durch das Übertragen erleidet die Wasseroberfläche einen Substanzverlust. Dieser muß durch ein Nachfahren der Barrieren ausgeglichen werden. Das wird erreicht, indem eine Regelung den Druck konstant hält. Aus der Flächenabnahme kann der Übertrag quantifiziert und aus dem Vergleich mit der Substratfläche das Übertragungs-verhältnis angegeben werden.

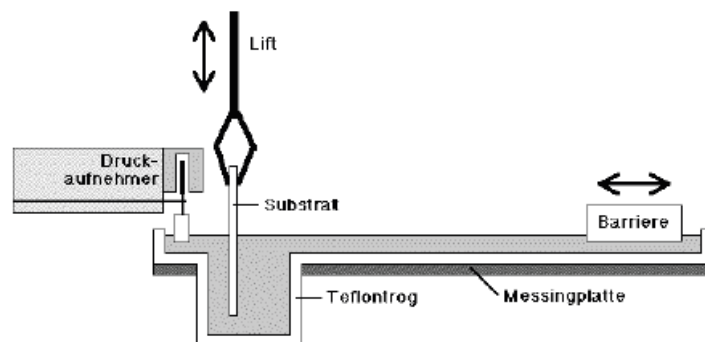


Abb. 2.3 Schema der Filmwaage für Präparationen nach der LB-Technik

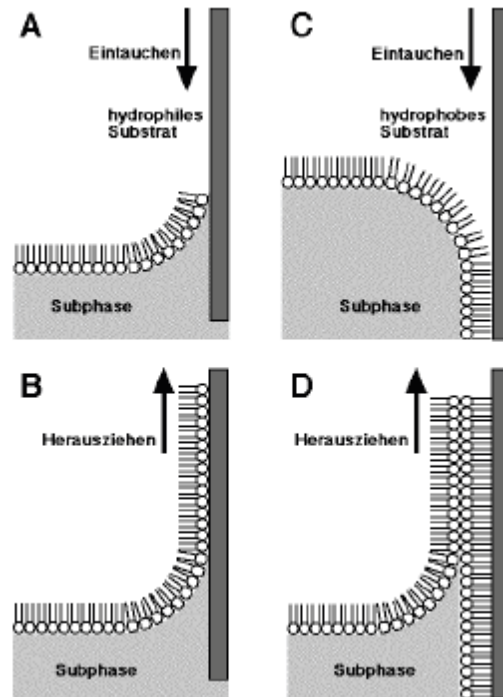


Abb. 2.4 Aufbau von Multischichten nach der LB-Technik

- (A) beim Eintauchen eines hydrophilen Substrates wird kein Film übertragen
- (B) beim Herausziehen desselben Substrates beschichtet sich das Substrat mit einer Monoschicht
- (C) Übertrag einer Monoschicht auf ein hydrophobes Substrat durch Eintauchen
- (D) beim Herausziehen desselben Substrates wird eine zweite Monoschicht übertragen

2.4 Der Förster-Perrinsche Energietransfer

Wir betrachten im folgenden ein System von zwei fluoreszierenden Farbstoffmolekülen, bei denen sich die Emissionsbande des Donors und die Absorptionsbande des Akzeptors überschneiden. Regt man dieses System mit Licht der Wellenlänge an, die dem Absorptionsmaximum des Donors entspricht, so beobachtet man bei großem Abstand (d.h. viel größer als 100 \AA) der Donor-Akzeptor-Paare voneinander nur die Fluoreszenz des Donors. Verkleinert man diese Abstände, wird die Emission des Donors geringer und entsprechend fluoresziert jetzt der Akzeptor. Bei sehr geringem Abstand ist nur noch die Akzeptoremission zu sehen. Der Donor ist in diesem Fall völlig gelöscht.

Offensichtlich geht hier Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor über. Dieser Prozeß wird allgemein als Energie-Transfer oder Förster-Transfer bezeichnet.

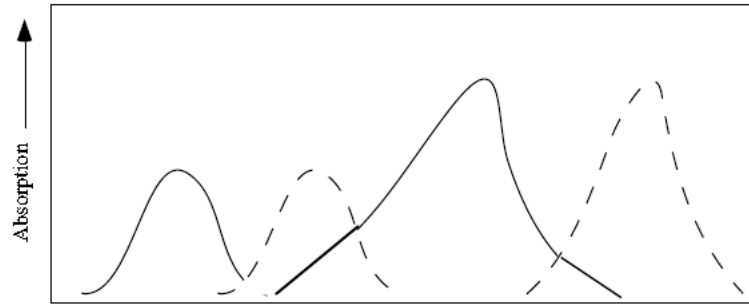


Abb. 2.4 Schematische Spektren eines Donor-Akzeptor-Paares, das für den Förster-Transfer geeignet ist (---- Absorption, - - - Emission)

Dieser Energietransfer erfolgt strahlungslos und kann klassisch als Wechselwirkung zweier Dipole erklärt werden. Quantenmechanisch folgt der Energietransfer aus der schwachen Kopplung zweier nahezu entarteter Systeme. Es ist charakteristisch für die schwache Kopplung, daß sich die Absorptionsspektren der Moleküle durch die Wechselwirkung nicht oder nur sehr schwach ändern.

Zur quantenmechanischen Herleitung der Transferrate nach Förster betrachten wir folgendes Energiediagramm:

Wird das Donormolekül durch Licht der Frequenz ν' angeregt, geht es sehr schnell in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten elektronischen Zustandes $|D_b\rangle$ über (geschlängelter Pfeil in Abb. 2.5). Stimmen nun die Emissionsenergie von D und die Absorptionsenergie von A überein, so kann durch die schwache Kopplung folgende Resonanz auftreten:

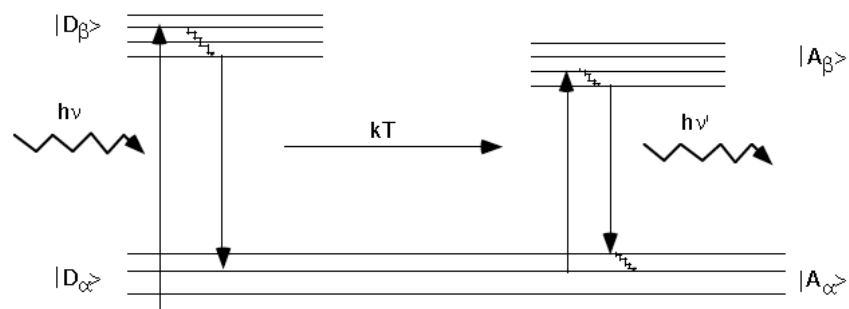


Abb. 2.5 Energieschema zum Förster-Transfer

Dabei haben wir jeweils den angeregten Zustand des einen Moleküls (b) und den Grundzustand des anderen (a) zu einer Gesamtwellenfunktion zusammengefasst. Jedoch befinden sich sowohl der Zustand $|D_a\rangle$ als auch $|A_b\rangle$ in einem angeregten Schwingungszustand, sodaß die schnelle Relaxation in den Schwingungsgrundzustand den rückwärtigen Prozess k_T praktisch unmöglich macht, auch wenn k_T sehr effektiv ist.

Die Transferrate k_T läßt sich mit Fermi's "Goldener Regel" berechnen nach:

$$k_T = \frac{1}{\hbar^2} \int_0^\infty |\langle D_b A_a | V | D_a A_b \rangle|^2 \rho_D(\nu) \rho_A(\nu) d\nu \quad (2.4.2)$$

Der Ausdruck $\rho_D(\nu)\rho_A(\nu)$ bezeichnet die Anzahl der Energiezustände im Intervall ν , $\nu+d\nu$ und beinhaltet die Franck-Condon-Faktoren sowie die Besetzungswahrscheinlichkeit der Vibrationszustände. V beschreibt die Wechselwirkung. Wir beschränken uns dabei auf den Dipol-Term und erhalten:

$$V = \frac{\mu_D \mu_A}{R_{AD}^3} - 3 \frac{(\mu_D R_{AD})(\mu_A R_{AD})}{R_{AD}^5} = \kappa \frac{|\mu_D||\mu_A|}{R_{AD}^3} \quad (2.4.3)$$

und

$$\kappa = \cos(\angle(\mu_D, \mu_A)) - 3 \cos(\angle(\mu_D, R_{AD})) \cos(\angle(\mu_A, R_{AD})) \quad (2.4.4)$$

$\mu = \sum_{i=1}^N q_i r_i$ bezeichnet das jeweilige Dipolmoment und R_{AD} den Abstand zwischen

Donor- und Akzeptormolekül.

Da μ_D nur von den Elektronenkoordinaten des Donors abhängt und μ_A nur von denjenigen des Akzeptors, läßt sich (2.4.4) schreiben als

$$k_T = \frac{\kappa^2}{R_{AD}^6} \frac{1}{\hbar^2} \int_0^\infty |\langle D_a | \mu_D | D_b \rangle|^2 |\langle A_b | \mu_A | A_a \rangle|^2 \rho_D(\nu) \rho_A(\nu) d\nu \quad (2.4.5)$$

Die Ausdrücke $|\langle D_a | \mu_D | D_b \rangle|^2$ und $|\langle A_b | \mu_A | A_a \rangle|^2$ werden als Übergangsdipolmomente bezeichnet und lassen sich aus den Einsteinkoeffizienten berechnen. Speziell gilt für den Akzeptor, da es sich hier um stimulierte Absorption handelt:

$$B_{ab} = \frac{2\pi}{3\hbar^2} |\langle A_b | \mu_A | A_a \rangle|^2 \quad (2.4.6)$$

Dieser Koeffizient läßt sich durch den im Absorptionsspektrum dekadischen Extinktionskoeffizienten ausdrücken:

$$B_{ab} = \frac{\ln 10 \ c \ \varepsilon(\nu)}{h\nu \ L'} \quad (2.4.7)$$

(c: Lichtgeschwindigkeit im Lösungsmittel, L': Anzahl Moleküle in mmol).

Damit ergibt sich:

$$|\langle A_b | \mu_A | A_a \rangle|^2 = \frac{3 \ln 10}{4 \pi^2 L'} \frac{c}{\nu} \frac{\hbar}{\nu} \varepsilon(\nu) \quad (2.4.8)$$

Ebenso läßt sich eine Beziehung für die spontane Emission (=Fluoreszenz) des Donors herleiten. Allgemein gilt für diesen Einstein-Koeffizienten:

$$A_{ba} = \frac{8 \pi}{c^3} \frac{h \nu^3}{\hbar} B_{ab} = \frac{32 \pi^3}{3 c^3 \hbar} \nu^3 |\langle D_a | \mu_D | D_b \rangle|^2 \quad (2.4.9)$$

Desweiteren gilt

$$A_{ba} = \frac{1}{\tau_D} \quad (2.4.10)$$

wobei τ_D die natürliche Lebensdauer des Zustandes $|D_b\rangle$ charakterisiert. Somit erhalten wir:

$$|\langle D_a | \mu_D | D_b \rangle|^2 = \frac{3 c^3}{32 \pi^3} \frac{\hbar}{\tau_D} \frac{1}{\nu^3} \quad (2.4.11)$$

Aus (2.4.8) und (2.4.11) ergibt sich die Transferrate schließlich zu

$$k_T = \frac{\kappa^2}{R_{AD}^6} \frac{1}{\tau_D} \frac{9 \ln 10}{128 \pi^5} \frac{c^4}{L' n^4} \int_0^\infty \frac{\varepsilon(\nu) f(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (2.4.12)$$

Dabei haben wir den Brechungsindex n des umgebenden Mediums eingeführt und berücksichtigt, daß die Zustandsdichten $\rho_D(\nu)$ und $\rho_A(\nu)$ in $\varepsilon(\nu)$ bzw. in $f(\nu)$, also der Form der spektren, enthalten sind. $f(\nu)$ ist die normierte Wahrscheinlichkeit für die Fluoreszenzemission im Intervall $\nu, \nu+d\nu$, d.h. es gilt:

$$\int_0^\infty f(\nu) d\nu = 1 \quad (2.4.13)$$

Die Transferrate ist also proportional dem Überlapp des Emissionsspektrums von D mit dem Absorptionsspektrum von A gewichtet mit $1/\nu^4$ und ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands. Die Gleichung enthält im übrigen keine Plancksche Konstante und kann somit auch rein klassisch hergeleitet werden (s. Försterling/Kuhn). In abgekürzter Form wird meist geschrieben:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{AD}} \right)^6 \quad (2.4.14)$$

R_0 bezeichnet man als den charakteristischen Transferradius, der für die meisten Systeme im Bereich von 10 - 100 Å liegt.

2.5 Energietransfer in einem System aus monomolekularen Schichten

Bisher haben wir nur den Energietransfer von einem Donor- zu einem Akzeptormolekül untersucht. Wir wollen im folgenden den Fall untersuchen, daß eine ebene Monoschicht Donormoleküle einer Schicht Akzeptormoleküle im Abstand d gegenübersteht. In diesem Fall geht die Energie von einem Donor auf viele Akzeptoren über und die gesammte Transferrate ergibt sich zu:

$$K_T = \sum_{i=1}^{\infty} k_T(i) = C \sum_{i=1}^{\infty} \frac{\kappa_i^2}{R_{A,D}^6} \quad (2.5.1)$$

C enthält dabei sämtliche Konstanten und das Integral von Gl. (2.4.12), i numeriert die einzelnen Akzeptormoleküle durch.

Nimmt man an, daß die Akzeptoren homogen in der Schicht verteilt sind, so kann man die Flächendichte σ einführen und die Summe durch ein Integral über die gesamte Oberfläche ersetzen:

$$K_T = C\sigma \int \frac{\kappa^2}{r^6} df \quad (2.5.2)$$

Zur Berechnung von κ muß man wissen, wie die Dipolmomente der Moleküle jeweils in der Schicht orientiert sind. Aufgrund der Tatsache, daß die hier verwendeten Cyaninfarbstoffe zusammen mit Behensäure in einem Mischungsverhältnis von etwa 1:10 vorliegen, kann man folgende Annahmen treffen:

- die Übergangsdipolmomente liegen alle in einer Ebene, d.h. senkrecht zur Flächennormalen
- Lage und Richtung der einzelnen Übergangsdipolmomente in der Ebene sind statistisch gleichverteilt

Bei diesen Annahmen ergibt sich für einen Schichtabstand d (s.Anhang):

$$K_T = \frac{3\pi}{16} C\sigma \frac{1}{d^4} \quad (2.5.3)$$

Ein angeregtes Donormolekül kann nun durch Fluoreszenzemission (k_F), durch strahlungslose Prozesse (k_S) oder durch Energietransfer (k_T) desaktiviert werden. Die Rate für einen Zerfall ohne Energietransfer sei $k = k_F + k_S$, die zugehörige Lebensdauer beträgt dann

$$\tau = 1/(k_F + k_S).$$

Bezeichnet man mit I_∞ die Intensität der Fluoreszenz von D falls keine Akzeptorschicht vorhanden ist und mit I_d die Intensität bei Anwesenheit im Abstand d , so ergibt sich das Verhältnis der beiden aus dem Verhältnis der Transferraten zu

$$\frac{I_d}{I_\infty} = \frac{k_F + k_S}{k_F + k_S + k_T} = \frac{1}{1 + \tau K_T} \quad (2.5.4)$$

Man definiert nun einen kritischen Abstand d_0 , bei dem Energietransfer und Fluoreszenz gleich wahrscheinlich werden:

$$\frac{1}{\tau} dt = k_T dt \Rightarrow \tau k_T = 1$$

$$\tau = \frac{16}{3\pi\sigma C} d_0^4 \quad (2.5.5)$$

Damit erhalten wir schließlich:

$$\frac{I_d}{I_\infty} = \frac{1}{1 + \left(\frac{d_0}{d}\right)^4} \quad (2.5.6)$$

Nach dieser Formel lässt sich der kritische Abstand d_0 sehr einfach experimentell bestimmen, indem man die Fluoreszenzemission des Donors bei verschiedenen Schichtabständen des Akzeptors misst.

Eine genaue Berechnung dieses Abstandes d_0 ist theoretisch möglich, aber sehr aufwendig und mit vielen Parametern behaftet, die experimentell schwer zugänglich sind. Es gilt:

$$d_0^4 = \frac{3\pi}{16} \frac{9 \ln 10}{128\pi^5} \frac{c^4}{L' n^4} \frac{\tau_S}{\tau_D} \sigma \int_0^\infty \frac{\varepsilon(\nu) f(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (2.5.7)$$

3 Aufgabenstellung

(a) Messen Sie eine Isotherme von Arachidinsäure auf reinem Millipore-Wasser.

Bestimmen Sie daraus den Phasenumwandlungsdruck und den Platzbedarf der Moleküle bei einem Druck von etwa 30 mN/m. Diskutieren Sie die Fehlerquellen! (Der aus Röntgendaten gewonnene Wert für den Platzbedarf beträgt ca. $19.8 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$). Ermitteln Sie außerdem das Gewicht und das Volumen der gespreiteten Arachidinsäure-Monoschicht!

(b) Stellen Sie einen Träger zur Messung des Energietransfers her.

Aus den mit dem Fluoreszenzspektrometer gewonnenen Daten erhalten Sie einen Ausdruck, der die Fluoreszenzintensität des Donors über den Ort aufgetragen zeigt.

Ordnen Sie die Intensitäten den einzelnen Schichtsystemen auf Ihrem Träger zu und bestimmen Sie das Verhältnis I_d/I_∞ .

(c) Sie erhalten vom Betreuer weitere (von anderen Gruppen gemessene) Werte I_d/I_∞ für jeweils andere d-Werte. Bestimmen Sie daraus den Förster-Abstand d_0 , indem Sie $\log(\frac{I_\infty}{I_d} - 1)$ über $\log(d)$ auftragen. Welcher Wert ergibt sich aus der Steigung der

Geraden und was erwarten Sie hierfür aus der Theorie?

Tragen Sie dann die Werte I_d/I_∞ gegen d auf und skizzieren Sie den theoretischen Kurvenverlauf. Zur Bestimmung von d benutzen Sie die nach Tanford berechnete Moleküllänge d_M . Erläutern Sie kurz, warum das Verschwinden der Donor-Emission nicht durch Re-Absorption durch den Akzeptor erklärt werden kann!

(d) Bestimmen Sie aus wenigstens einer der erhaltenen Isothermen das Übertragungsverhältnis beim LB-Transfer! Schätzen Sie außerdem ab, um wieviel sich die durchschnittliche molekulare Fläche bei dichtester Packung im Farbstoff-Arachidinsäure-Gemisch gegenüber reiner Arachidinsäure erhöhen sollte, und vergleichen Sie diesen Wert mit dem experimentell erhaltenen.

4 Praktische Durchführung

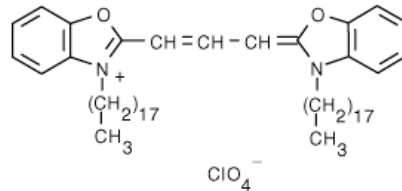
4.1 Verwendete Substanzen

Die für die Messung des Energietransfers verwendeten Farbstoffmoleküle sind in Abb. 4.1 dargestellt. Es handelt sich um Carbocyanine, die auf Grund der Octadecylketten amphiphil sind und somit spontan Monoschichten bilden. Um die Stabilität des Films zu erhöhen und um zu starke Aggregation der Farbstoffmoleküle zu verhindern, müssen sie in einem Molverhältnis von mindestens 1:10 mit einer Fettsäure vermischt werden. Hier verwenden wir Arachidinsäure. Beide Farbstoffe liegen in einer etwa 10^{-4} M Lösung vor, Arachidinsäure in einer etwa 10^{-3} M Lösung; Lösungsmittel ist jeweils CHCl_3 .

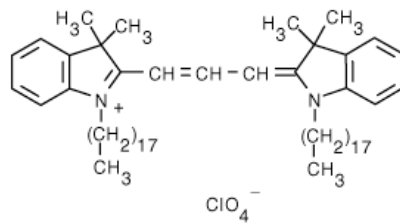
Als Subphase wird in der Filmwaage Reinstwasser verwendet. In einer Millipore-Anlage werden dem durch eine Umkehrosiose vorgereinigten Wasser durch eine

vierfache Filterung sowohl Ionen als auch oberflächenaktive biologische und chemische Substanzen entzogen. Es besitzt dann einen spezifischen elektrischen Widerstand von 18.2 MΩcm.

Donor: DiOC₁₈(3)3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiO); M=881 gmol⁻¹



Akzeptor: DiIC₁₈(3)1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI); M=934 gmol⁻¹



Fettsäure: Arachidinsäure; M=312 gmol⁻¹; CH₃-(CH₂)_n-COOH, n=18

Abb. 4.1 Verwendete Substanzen

4.2 Spreiten der filmbildenden Substanzen

Der Trog wird ein bis zwei Millimeter bis über den inneren Rand mit der Subphase gefüllt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Teflons bildet sich ein Meniskus.

Zum Spreiten zieht man die in CHCl₃ gelöste Substanz in eine µl-Spritze auf und bringt dann langsam Tropfen für Tropfen auf die Wasseroberfläche. Beim Auseinanderlaufen eines Tropfens sieht man farbige Interferenzringe. Das Lösungsmittel verdunstet recht schnell und läßt die filmbildende Substanz zurück.

Da für eine Monoschicht nur sehr wenig Substanz benötigt wird (10¹⁶ Moleküle!), muß gerade beim Spreiten auf größte Sauberkeit geachtet werden. Auf gar keinen Fall dürfen die Spitze der Spritze oder gar die Wasseroberfläche in der Filmwaage mit den bloßen Händen in Berührung kommen!

Zum Reinigen der Spritze und um eine Verdünnung der eingewogenen Substanz zu vermeiden, empfiehlt sich beim Spreiten folgende Vorgehensweise:

- Spritze dreimal mit Lösungsmittel spülen
- Spritze einmal mit Substanz spülen
- benötigte Substanz aufziehen und spreiten
- Spritze dreimal mit Lösungsmittel spülen.

Die Menge gespreiteter Substanz kann aus den Moleküldaten (Abb. 4.1), den angegebenen Konzentrationen der Lösungen und der Trogoberfläche berechnet werden. Man spreitet jeweils soviel, daß eine dichteste molekulare Packung (bei Arachidinsäure etwa $20\text{\AA}^2/\text{Molekül}$) ungefähr bei halber Fläche der Filmwaage erreicht wird. Bei einer Farbstoff-/Fettsäure-Mischung erfolgt der Druckanstieg entsprechend dem größeren Platzbedarf der Farbstoffmoleküle früher.

4.3 Übertragen der Filme auf feste Substrate

Als Träger dienen Glasplättchen. Sie müssen vor Verwendung gründlich gereinigt werden. Dazu werden die Gläser zuerst mit Aceton abgerieben und anschließend nach der RCA-Methode ($\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_3=5:1:1$ Teile bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ für 15 Minuten) gereinigt. Danach sind die Glsträger hydrophil und werden unter Wasser aufbewahrt.

Um diese Träger zu hydrophobisieren beschichtet man sie nach einem Verfahren von Sagiv (2. Teil der RCA-Methode) mit einer Schicht Oktadecyl-Trichlor-Silan (OTS). Diese Schicht ist kovalent an das Glas gebunden. Somit können diese Gläser normal in einem Präparateglas aufbewahrt werden.

Beim Einspannen des Trägers in die Halterung des Dippers darf dieser nur am oberen Teil mit einer Pinzette gefaßt werden. Die unteren drei Viertel, die in die Subphase eintauchen, dürfen weder mit den Fingern noch mit der Pinzette berührt werden!

Der Übertrag geschieht bei einem Filmdruck von 30 mN/m , der als Solldruck an der Filmwaage eingestellt wird. Bei diesem Druck befindet sich der Film in einer kondensierten Phase, die Moleküle besitzen dichteste Packung. Die Tauchgeschwindigkeit des Dippers wird auf 0.05 mm/s eingestellt.

Beim Austauschen eines unbeschichteten, hydrophilen Trägers zeigt der Meniskus nach oben. Das Austauschen muß langsam erfolgen, damit das Wasser zwischen Film und Glas ablaufen kann. Der Träger muß vollständig herausgezogen werden und darf

die Wasseroberfläche nicht mehr berühren. In diesem Zustand muß der Träger völlig trocken aussehen, am unteren Rand sollten keine Wassertropfen hängenbleiben. Beim Eintauchen des nun hydrophoben Trägers muß der Meniskus waagrecht sein oder nach unten zeigen und gleichmäßig um das Plättchen herumlaufen. Die Barrieren sollten beim Ein- und Austauchen gleichmäßig Film nachschieben (Barrierengeschwindigkeit 0.15 mm/s). Bleiben sie stehen oder fahren zurück bedeutet dies, daß kein Film übertragen wird bzw. sich sogar wieder ablöst. Die Träger sind dann nicht sauber und müssen erneut gereinigt werden. Zur Herstellung der Multischichtstruktur, wie weiter unten beschrieben, muß der Film mehrmals gewechselt werden, während der bereits teilweise beschichtete Träger eingetaucht bleibt. Hierin liegt eine wesentliche Fehlerquelle für die Energietransfermessungen. Wird der alte Film nicht vollständig entfernt, können seine Reste zusammen mit dem neuen Film übertragen werden. Deshalb muß hier der gesamte Film sehr sorgfältig abgesaugt werden bis auf den Teil, der in der Vertiefung unterhalb des Dippers zurückbleibt. Der Träger muß dabei immer unter Wasser bleiben!

4.4 Aufbau des Multischichtsystems zur Messung des Energietransfers

Zur Messung des Energietransfers werden zwei Proben wie in Abb. 4.2 gezeigt hergestellt. Damit kann die Fluoreszenzintensität des Donors allein (I_{∞}) und die des Donors bei Anwesenheit des Akzeptors im Abstand d (I_d) gemessen werden.

Zur Herstellung des Schichtsystems geht man wie folgt vor:

- beide Glasträger mit 3 Schichten Arachidinsäure vorbeschichten
- Film absaugen, einmal mit Wasser spülen, Arachidinsäure/Farbstoff (Donor) – Gemisch spreiten
- Glasträger eintauchen
- Film absaugen, einmal mit Wasser spülen, Arachidinsäure spreiten
- Glasträger austauschen und einen der Glasträger abnehmen
- n mal den verbliebenen Träger aus- und wieder eintauchen (ergibt $n=0,1,2,3$ Doppelschichten; jede Gruppe präpariert nur einen Wert n ; vom Betreuer erfragen!)
- Film absaugen, einmal mit Wasser spülen, Arachidinsäure/Farbstoff (Akzeptor) – Gemisch spreiten
- Glasträger austauschen

- Film absaugen, einmal mit Wasser spülen, Arachidinsäure spreiten
- eine Doppelschichten als Schutzschicht aufziehen (verhindert Oxidation des Akzeptors)

Die fertigen Träger sollten nach Möglichkeit sofort vermessen werden.

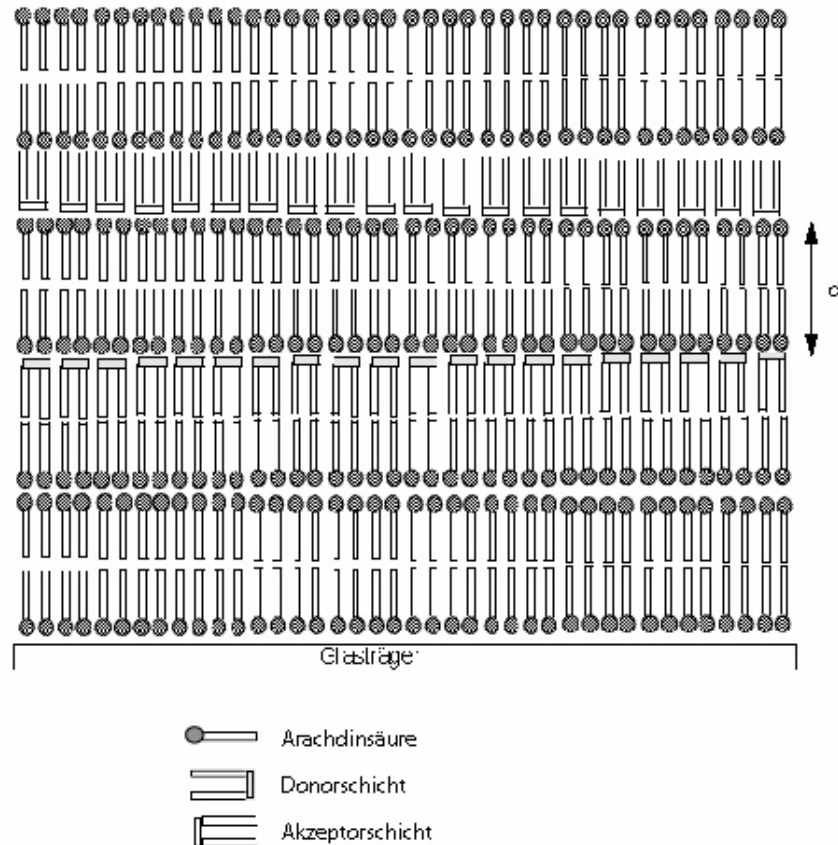


Abb. 4.2 Multischichtsystem zur Messung des Energietransfers

4.5 Fluoreszenzmessungen

Die beschichteten Glasträger werden mit dem FS900CDT Steady State Fluoreszenzspektrometer der Firma Edinburgh Instruments gemessen (schematischer Überblick Abb. 4.3). Als Anregungsquelle dient eine Xenon-Hochdrucklampe. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß die Lampe nicht ohne Kühlung betrieben werden darf. Anregung und Emission werden über Gittermonochromatoren realisiert, das Emissionssignal mit einem Photomultiplier detektiert.

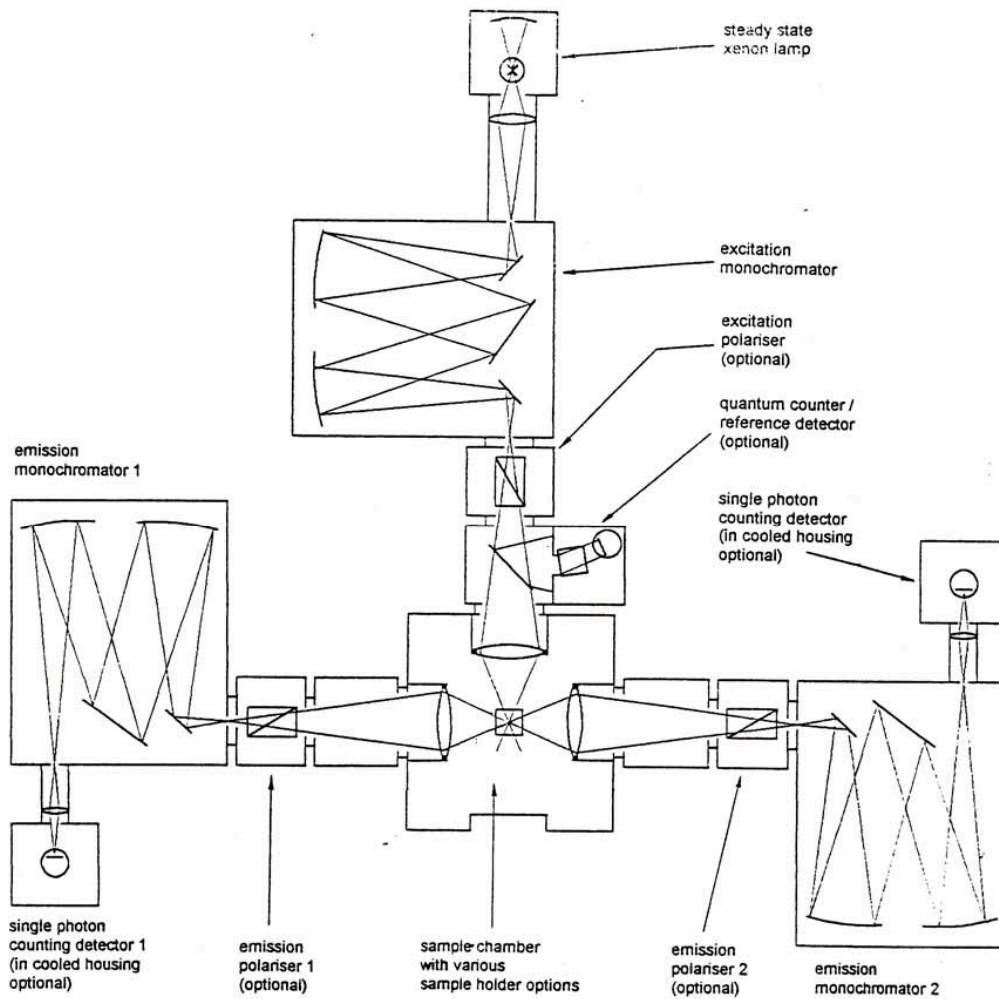


Abb. 4.3 Optische Anordnung des FS900CDT Spektrometers

Nähere Erläuterungen zum Spektrometer sind dem Handbuch zu entnehmen.

4.6 Versuchsparameter

Filmwaage: max. Position 164 mm
 min. Position 26 mm
 Breite 100 mm

Substanzen: Arachidinsäure, $c=0,78$ mg/ml
 Donor DiO, $c=0,99$ mg/ml
 Akzeptor DiI, $c=0,92$ mg/ml

Barrierengeschwindigkeit beim Komprimieren 0,1 mm/s, beim Dippen 0,15 mm/s
 Dippergeschwindigkeit 0,05 mm/s

Literatur

Försterling, Kuhn: "Praxis der Physikalischen Chemie", Verlag Chemie, Weinheim, 1985

Cantor, Schimmel: "Biophysical Chemistry", Part II, Freeman, San Francisco 1980

Kuhn, Möbius: Angew. Chemie, **83** (1971) 672

Labhart: Naturwiss. **64** (1977) 247

Petty: "Langmuir Blodgett films: an introduction", Cambridge University Press, 1996
(Standardwerk zum Thema Monolayer)

Adamson: "Physical Chemistry of Surfaces", Wiley, 1982

Tanford: J. Phys. Chem., **76** (1972) 3020