

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Einzelmolekülspektroskopie von organischen
Farbstoffmolekülen in porösen Festkörpern
und
Tiefemperaturspektroskopie an dem
grün fluoreszierenden Protein

Christian Florian Seebacher

aus

München

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. C. Bräuchle betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt

München, am 6.6.2002

Dissertation eingereicht am:	21.6.2002
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. C. Bräuchle
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. Bein
Mündliche Prüfung am	15.7.2002

1	Einleitung	1
2	Grundlagen und Methoden	4
2.1	Gast/Wirt-Systeme	4
2.1.1	Neue Materialien	4
2.1.2	Variationsmöglichkeiten	9
2.1.3	Ziele: Molekulare Funktionen	11
2.2	Vorteile von Messungen an einzelnen Molekülen	15
2.3	Verschiedene bisher realisierte Experimente	16
2.3.1	Änderungen der Fluoreszenzspektren einzelner Moleküle	16
2.3.2	Orientierung einzelner Moleküle und deren Änderungen	17
2.3.3	Fluoreszenzdyamik	18
2.4	Diffusion	19
2.4.1	Statistik und molekulare Beschreibung von Diffusion	19
2.4.2	Makroskopische Theorie der Diffusion	21
2.4.3	Weitere Methoden der Diffusionsmessung	24
2.5	Mikroskopie	26
2.5.1	Optik im Mikroskop	27
2.6	Experimenteller Aufbau	37
2.6.1	Strahlengang	38
2.6.2	Detektionsmethoden	44
3	Probensysteme	61
3.1	Farbstoffe	61
3.1.1	Das Drei-Niveau System	61
3.1.2	Absorptionsspektren, Fluoreszenzanregungsspektren	62
3.1.3	Fluoreszenzspektren	64
3.1.4	Fluoreszenzlebensdauern	64
3.1.5	Fluoreszenzquantenausbeuten	65
3.1.6	Orientierungen	66
3.1.7	Dunkelzustände von Farbstoffen	67
3.1.8	Photostabilität	69
3.1.9	Größe der Farbstoffe	76
3.1.10	Parameter ausgewählter Farbstoffe	77
3.1.11	Zusammenfassung	84
3.2	Porensysteme	85
3.2.1	Faujasit	85
3.2.2	Porosile	86
3.2.3	AlPO ₄ -5	89
3.2.4	Mesoporöse M41S Materialien	91
3.2.5	Übersichtstabelle	94
3.3	Einbau der Farbstoffe in die Poren	95
3.3.1	Kristallisationseinschluß	95
3.3.2	In situ-Synthese	96
3.3.3	Diffusion	97
3.3.4	Ionenaustausch	98
3.3.5	Tabelle aller vorhandenen Proben	98
4	Ergebnisse	101
4.1	Fluoreszenzbilder mit vielen Farbstoffmolekülen (Ensemble)	101
4.1.1	Oxazin 1 in AlPO ₄ -5	101

4.1.2	Mesoporen in kalziniertem Silikalit-1	103
4.1.3	NaX	106
4.1.4	ALPO ₄ -5	106
4.1.5	Zusammenfassung	112
4.2	Dynamik an vielen Molekülen (Ensemble)	112
4.2.1	Monolith	113
4.2.2	UTD-1	116
4.2.3	M41S Nadeln	119
4.2.4	Photoprodukte	122
4.3	Fluoreszenzimagining einzelner Moleküle	123
4.3.1	Referenzmessungen in dünnen Polymerproben:	123
4.3.2	Poröse Festkörper	128
4.4	Dynamische Intensitätsmessungen an einzelnen Molekülen	133
4.4.1	Kurzzeit	133
4.4.2	Triplett aus Zeitspuren	135
4.4.3	Triplett aus FCS	139
4.4.4	Bleichen	143
4.4.5	Blinken	146
4.4.6	Diffusion	146
4.4.7	TDI Monolith	147
4.4.8	TDI Flüssigkristall	153
4.4.9	Vergleich der Diffusion Monolith / Flüssigkristall	155
4.4.10	Schmelzen von Octadecan mit TDI	155
4.5	Orientierung von vielen Farbstoffmolekülen (Ensemble)	157
4.5.1	AlPO ₄ -5 - Oxazine	160
4.5.2	Cy5 MCM41	162
4.6	Orientierung einzelner Moleküle	164
4.6.1	TDI in PMMA	165
4.6.2	TDI in PMMA Dynamik	166
4.6.3	Cy5 in MCM 41	168
4.6.4	Cy5 in MCM 41, Einbettung in Lösungsmitteln	172
4.6.5	Oxazin in AlPO ₄ -5	173
4.6.6	Oxazin in AlPO ₄ -5 Orientierungsdynamik	176
4.6.7	TDI im Monolith	178
4.6.8	TDI - UTD-1 Orientierungen	181
4.7	Fluoreszenzspektren (Ensemble)	182
4.7.1	Silikalit 1 / UTD-1 mit Tetracen / Pentacen	183
4.7.2	Photoprodukt von Rhodamin 6G	184
4.7.3	Photoprodukt von TDI	185
4.8	Fluoreszenzspektren von einzelnen Molekülen	185
4.8.1	TDI in PMMA	186
4.8.2	Spektrale Dynamik von TDI in PMMA	187
4.8.3	MCM-41 mit Cy5	195
4.8.4	AlPO ₄ -5 mit Oxazin Farbstoffen	196
4.8.5	Monolith mit TDI	202
4.8.6	UTD-1 mit TDI	204
4.8.7	Zusammenfassung	205
4.9	Gleichzeitige Messungen mehrerer Parameter an einzelnen Molekülen	205
4.9.1	Fluoreszenzdynamik und Fluoreszenzspektren	206
4.9.2	Orientierung und Fluoreszenzspektren	209

4.9.3	Zusammenfassung	214
5	Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	215
5.1	Grundlagen von GFP	215
5.1.1	Proteinstruktur	215
5.1.2	Photophysik von GFP	216
5.1.3	Theorie zur Tieftemperaturspektroskopie	217
5.2	Experimenteller Aufbau	218
5.2.1	Probensystem	218
5.2.2	Fluoreszenzanregungsspektren (FLA)	218
5.2.3	Fluoreszenzspektren	219
5.2.4	Temperatur-Ableitungs-Spektroskopie	219
5.3	Ergebnisse	220
5.3.1	Spektrales Lochbrennen	220
5.3.2	Wildtyp-GFP Photoprodukte	221
5.3.3	Kurzzeitmessungen an Wildtyp-GFP	225
5.3.4	Potentialschema für Wildtyp-GFP	227
5.3.5	Stabilisierung von Grundzuständen durch Mutationen	228
5.4	Überblick	230
6	Zusammenfassung	232
7	Literaturverzeichnis	237
8	Anhang	244
8.1	Veröffentlichungen	244
8.2	Tagungsbeiträge	244
8.3	Farbstoffe	246
8.4	GFP-Spektren	248
8.4.1	Wildtyp	248
8.4.2	Thr203Val	249
8.4.3	Glu222Gln	249
8.4.4	Thr203Val Glu222Gln	250
8.4.5	Ser65Gly	250
8.4.6	Rot fluoreszierendes Protein (DsRed)	251
8.4.7	Thr203Tyr	251
8.4.8	Thr203Tyr Ser65Gly	252
8.4.9	Thr203Tyr Glu222Gln	252
8.4.10	Glu222Gln Ser65Gly	253
8.4.11	Thr203Val Glu222Gln Ser65Gly	253
8.4.12	Thr203Tyr Glu222Gln Ser65Gly	254
8.4.13	EGFP (Ser65Thr Phe64Leu)	254
8.4.14	Tyr66Trp	255
8.5	Programme	255
8.5.1	Scripten für Origin 6	255
8.5.2	Labview Programme	256
8.5.3	Visual-Basic Programme	258

1 Einleitung

Die elementaren Bausteine der Materie bestehen aus der Sicht des Chemikers aus Atomen und Molekülen. So ist die Detektion, Analyse und Manipulation von einzelnen Atomen und Molekülen das ultimative Limit der Chemie, wenn es um die Handhabung ihrer elementaren Bausteine geht. Durch den wissenschaftlichen Fortschritt ist es in der heutigen Zeit möglich geworden, mit einzelnen Atomen und Molekülen Experimente durchzuführen.

Erstmals gelang es Binnig und Rohrer 1981 mit dem Rastertunnelmikroskop (STM, scanning tunnel microscope) atomare Auflösung zu erreichen [Binnig1982]. Eine Weiterentwicklung ist das Rasterkraftmikroskop (AFM, atomic force microscope) [Binnig1986], bei dem eine atomare Auflösung 1995 auf einer nichtleitenden Oberfläche erreicht worden ist [Giessibl1995]. Auch mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) kann atomare Auflösung erreicht werden [Fultz2001]. Im Gegensatz zur optischen Mikroskopie sind all diese Methoden jedoch auf Oberflächen oder dünne Schichten beschränkt.

Vor gut zehn Jahren konnte die Lichtempfindlichkeit der optischen Mikroskopie bis zur Detektion eines einzelnen Farbstoffmoleküls gesteigert werden [Moerner1989] [Orrit1990]. Die Größe des Farbstoffmoleküls von etwa 1 nm kann aufgrund des optischen Beugungslimits jedoch nur in etwa 300 nm großen Beugungsbilder abgebildet werden. Mit der optischen Einzelmolekülspektroskopie (SMS, single molecule spectroscopy) können zahlreiche Informationen über das Farbstoffmolekül erhalten werden. Die Bestimmungsgenauigkeit der Orientierung des Farbstoffmoleküls wird zum Beispiel lediglich von der Meßqualität bestimmt. So kann der Orientierungswinkel auf $0,5^\circ$ bestimmt werden, wodurch sehr kleine Bewegungen eines einzelnen Moleküls beobachtet werden können. In den letzten 12 Jahren hat sich die Spektroskopie und Mikroskopie von einzelnen Molekülen in Physik, Chemie und Biologie zu einem wichtigen und eigenständigen Gebiet entwickelt [Basche1996] [Wild1996] [Nie1997] [Xie1998] [Moerner1999] [Weiss1999] [Moerner2002] [Tamarat2000] [Rigler2001].

Eines der Hauptanwendungsgebiete der SMS liegt heute im Bereich der Biologie [Ishii2000] [Schmidt1996] [Seisenberger2001]. In dieser Arbeit soll jedoch gezeigt werden, daß auch in den Materialwissenschaften die Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt werden kann. Im Zentrum der Arbeit stehen dabei anorganische Molekularsiebe, deren Poren organische Fluoreszenzfarbstoffe enthalten. Durch den Einschluß von Gastmolekülen in Molekularsiebe können Materialien mit einstellbaren chemischen und physikalischen Eigenschaften hergestellt werden [Behrens1996] [Moller1998] [Langley1999] [Ozin2000]. Die hohe Ordnung der Porenstruktur wird dabei auf die Anordnung der Gastmoleküle übertragen. Mit chemischen Methoden können Porenstrukturen mit nahezu jedem beliebigem Porendurchmesser hergestellt werden [Schüth1995]. Besonders vielversprechend sind die optischen Eigenschaften von organischen Farbstoffmolekülen als Gastmolekül in der Porenstruktur. So wurden auf dieser Basis bereits z.B. Kristalle zur Frequenzverdopplung [Marlow1994], Farbstofflaser [Ihle1998], optische Schalter [Wöhrle2001] und Sensoren [Meinershagen1999] hergestellt. Die Größe eines organischen Farbstoffmoleküls mit ca. 1 nm bestimmt in diesen Anwendungen den passenden Porendurchmesser der Wirtstrukturen. Die Eigenschaften dieser neuen Materialien

hängen oft sehr davon ab, ob der Farbstoff wirklich definiert in den Molekularsieb eingebaut wird. Mit einem konfokalen Mikroskop soll daher die Homogenität der farbstoffbeladenen Molekularsiebe untersucht werden. Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens des konfokalen Mikroskops ist es möglich, die dreidimensionale Konzentrationsverteilung der Farbstoffmoleküle zu bestimmen. Als weitere Information kann aus der Polarisierung des Lichtes die Orientierung, aus der Zeit die Fluoreszenzlebensdauer und aus der Photonenenergie das Fluoreszenzspektrum gewonnen werden. Richtig interessant werden die Untersuchungen dadurch, daß aufgrund der hohen Sensitivität der Fluoreszenzmikroskopie sogar die einzelnen Farbstoffmoleküle in der Porenstruktur beobachtet werden können. Dadurch können von den beobachteten Heterogenitäten auch die Verteilungsfunktionen bestimmt werden, von denen bei einer Messung an vielen Molekülen (Ensemble) nur der Mittelwert erhalten wird. Schließlich erlaubt es die Einzelmolekülspektroskopie sogar dynamische Änderungen im Verhalten von individuellen Molekülen zu beobachten.

Die Entwicklung von farbstoffbeladenen Molekularsieben, in denen organische Farbstoffmoleküle Funktionen besitzen, ist ein Ziel der Bemühungen im Arbeitskreis Bräuchle. Diese Entwicklung wird in Zusammenarbeit mit verschiedenen synthetischen Arbeitsgruppen vorangetrieben. So könnten Bauteile wie optische Schalter, Ventile oder Rotoren auf der Basis eines einzelnen Moleküls realisiert werden. Für die Synthese der anorganischen Strukturen wurden Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von P. Behrens aus Hannover, F. Schüth aus Mühlheim/Ruhr und D. Wöhrle aus Bremen geschlossen. Erste Arbeiten gemeinsam mit der Arbeitsgruppe T. Bein in München wurden aufgenommen.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem grün fluoreszierendem Protein (GFP). Dieser Teil der Arbeit wurde als Fortsetzung der Diplomarbeit kurzzeitig neben den anderen Arbeiten durchgeführt. Das GFP Molekül besteht nur aus einer Aminosäuresequenz und ist genetisch codierbar [Brejc1997]. Es kann daher in jeder beliebigen Zelle erzeugt werden. Dadurch hat dieses Protein in den letzten Jahren die Molekularbiologie revolutioniert [Stearns1995] und ist mittlerweile mit seinen Varianten das am meisten genutzte Markerprotein. Zur Aufklärung der Fluoreszenzeigenschaften wurden Kurzzeit- und Tieftemperaturexperimente (über 77 K) durchgeführt [Chattoraj1996] [Lossau1996]. Tieftemperaturexperimente an Proteinen, die natürlich nicht physiologischen Bedingungen entsprechen, dienen dazu, die schnelle Beweglichkeit der Proteine einzufrieren, um verschiedene Sub-Zustände zu beobachten [Parak1993]. In dieser Arbeit wurden bei Temperaturen von flüssigem Helium (ca. 2K) fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an GFP durchgeführt. Die Erniedrigung der Temperatur unter 20 K ermöglicht die Anwendung von hochaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie wie Fluoreszenzlinienverschmälerung [Vanderkooi1997] und spektralem Lochbrennen [Friedrich1995] [Völker1989]. Neben dem Wildtyp - GFP wird auch eine Reihe von gentechnisch erzeugten Varianten untersucht, um Struktur-Eigenschafts Beziehungen aufzuklären. Die verschiedenen Proteine wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von B. Steipe vom Genzentrum der LMU hergestellt.

Die Arbeit ist wie folgt gegliedert:

Im 2. Kapitel werden die Grundlagen und die experimentelle Durchführung beschrieben. Hier werden die Grundlagen der Diffusion, die Optik im konfokalen

Mikroskop, bisher bekannte und für die Arbeit relevante Experimente und der gesamte experimentelle Aufbau beschrieben.

Das 3. Kapitel beschäftigt sich mit dem chemischen und physikalischen Aufbau der Probensysteme. Dazu gehören die Farbstoffe mit ihren physikalischen Prozessen beim Fluoreszenzvorgang, die Strukturen der porösen Festkörper und die Herstellung der Proben.

Im 4. Kapitel werden dann die Ergebnisse der durchgeführten Experimente vorgestellt. Der Inhalt in diesem Kapitel ist nach den fundamentalen Eigenschaften von Licht geordnet. Erst wird der Ort, dann die Intensität, anschließend die Polarisation und schließlich die Fluoreszenzphotonenenergie (Fluoreszenzspektren) behandelt. Innerhalb der einzelnen Unterkapitel werden erst Experimente mit vielen und dann mit einzelnen Molekülen präsentiert. Die Einzelmolekülexperimente werden schließlich noch in statische und dynamische Untersuchungen unterteilt.

Im 5. Kapitel wird ein sehr kurzer Überblick über die durchgeführten Tieftemperaturuntersuchungen an den grün fluoreszierendem Protein (GFP) gegeben.

Das abschließende 6. Kapitel faßt den wichtigsten Inhalt der Arbeit kurz zusammen.

2 Grundlagen und Methoden

2.1 Gast/Wirt-Systeme

Ein Festkörper (Wirt), in dem freie Plätze mit Molekülen (Gast) besetzt werden wird als Wirt/Gast-System bezeichnet. Mechanische, chemische und physikalische Wechselwirkungen zwischen den freien Plätzen und den eingelagerten Molekülen führen zu einer wohldefinierten Ordnung der Gäste auf der molekularen Längenskala. Dadurch werden Materialeigenschaften erzielt, die sich von den freien Molekülen drastisch unterscheiden [Langley1999].

Als Wirt werden entweder organische Molekülkristalle [Roth1998] oder anorganische Molekularsiebe, die meist aus den Elementen Si, O und Al bestehen verwendet. In dieser Arbeit werden als Wirt nur anorganische Gerüststrukturen und als Gast organische Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Bisher werden anorganischen Molekularsiebe überwiegend als "Wasserenthärter" in Waschmitteln und als hochselektive Katalysatoren bei der Benzinherstellung eingesetzt. Der mengenmäßig größte Verbraucher von Zeolithen ist die Waschmittelindustrie mit ca. 700.000 Tonnen pro Jahr [Erlangen2001]. Ein witziges Beispiel für eine neue Anwendung ist ein selbstkühlendes Bierfaß [Zeotech2002]. Dieses funktioniert aufgrund der Möglichkeit von Zeolithen reversibel Wasser zu binden und dadurch dessen 'Verdunstungskälte' zu speichern.

2.1.1 Neue Materialien

Obwohl viele grundlegende Eigenschaften der Wirt/Gast-Systeme unverstanden sind, wurden in den letzten Jahren bereits einige neuartige Materialien auf der Basis von zeolithgekapseltem Farbstoffen realisiert. Einige Beispiele sollen hier kurz diskutiert werden. Verschiedene Übersichtsartikel sind von den Gruppen Behrens et al. [Behrens1996] Bein et al. [Moller1998] Ozin et al. [Ozin2000] und Schüth et al. [Schüth1995] erschienen.

2.1.1.1 Optische Frequenzverdopplung

In der optischen Informationsverarbeitung und -speicherung (Photonik) benötigt man Materialien mit starken Licht-Materie-Wechselwirkungen, also großen optischen Nichtlinearitäten. Die wichtigen Prozesse der optischen Frequenzverdopplung (second harmonic generation, SHG) und des Pockelseffekts, benötigen dabei Strukturen die keine Inversionssymmetrie besitzen dürfen. Es gibt zwar viele Moleküle, die für diese Anwendungen hervorragend geeignet wären, jedoch im Molekülkristall oder eingebettet im Polymer eine Inversionssymmetrie aufweisen. Es wurde gezeigt, daß diese Moleküle durch die Einlagerung in die röhrenförmigen eindimensionalen Strukturen des anorganischen Molekularsiebs $\text{AlPO}_4\text{-5}$ gleichmäßig ausgerichtet werden können. Dadurch wird die Inversionssymmetrie gebrochen und es entstehen Materialien, die effektive optische Frequenzverdopplung erlauben [Cox1988] [Marlow1994] [Caro1992]. Abbildung 1 stellt schematisch die geordnete Anordnung der Moleküle im Kristall dar.

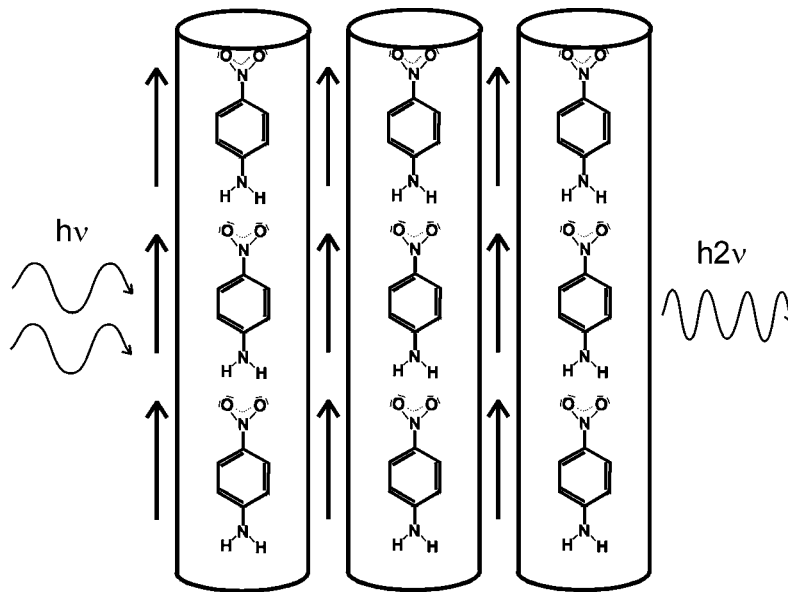


Abbildung 1: Ordnung von p-Nitroanilin im $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall. Die p-Nitroanilin Moleküle sind gleich ausgerichtet. Aufgrund der nicht vorhandenen Inversionssymmetrie ist nun optische Frequenzverdopplung möglich.

2.1.1.2 Farbstofflaser

Aufgrund der räumlichen Trennung der Gastmoleküle in einem Wirt/Gast-System ist es möglich, sehr hohe Farbstoffkonzentrationen in einen Zeolith einzulagern, ohne daß es zur Bildung von Dimeren oder Agglomeraten kommt. Dies ermöglicht die Konstruktion eines extrem kleinen Farbstofflasers. Innerhalb der reflektierenden Innenseiten eines sechseckigen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalls kann die sogenannte "whispering gallery"-Mode als Ringresonator verwendet werden (siehe Skizze rechts oben in Abbildung 2). Abbildung 2 zeigt einen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall als Laser.

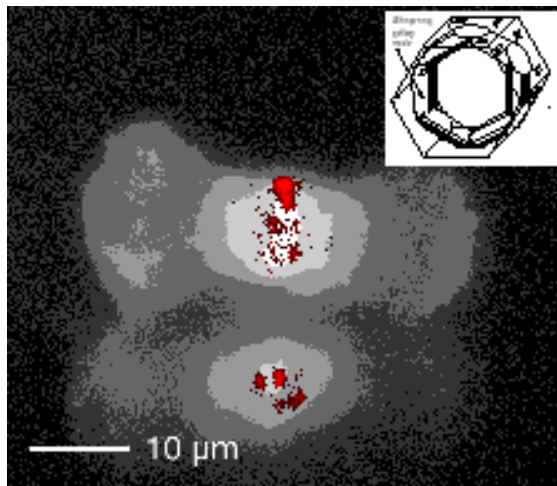


Abbildung 2: Farbstofflaser aus einem kleinen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall. Der etwa $20\mu\text{m}$ lange und $8\mu\text{m}$ dicke, an den Enden ausgefranste Kristall, liegt auf einem Spiegel. Das Spiegelbild des Kristalls (untere Hälfte) zeigt andere Punkte, aus denen das Laserlicht aus dem Kristall austritt (die dunkeln Punkte). Dadurch kann gezeigt werden, daß die Lichtemission gerichtet ist. Aus [Laeri1998] Fig2.

Das Licht, das aus den Seiten des Kristalls austritt, hat im Gegensatz zur Fluoreszenz ein sehr schmales Spektrum [Ihle1998].

2.1.1.3 Elektronentransfer, Energietransfer

In einer Reihe von Experimenten wurde auch gezeigt, daß unter bestimmten Bedingungen die Porenstruktur von Zeolith L oder Y die Selbstorganisation von mehrkomponentigen Elektronentransfer-Systemen induziert [Krueger1988]. Ein primäres Akzeptormolekül Dialkyl-2,2'-bipyridinium und ein sekundäres Akzeptormolekül Benzylviologen orientieren und assoziieren in der Kanalstruktur des Zeoliths, während das voluminöse Donormolekül Rutheniumtrisbipyridyl an der Kristalloberfläche fixiert bleibt. In anderen Beispielen wird der Donor und der Akzeptor innerhalb des Faujasitgerüsts immobilisiert [Borja1993] [Yoon1994]. Solche Elektronentransfersysteme arbeiten ähnlich der biologischen Photosynthese und können zur Energiespeicherung verwendet werden.

In der Gruppe um G. Calzaferri werden künstliche Lichtsammelkomplexe konstruiert [Gfeller1998]. Dazu werden bis zu drei verschiedene Farbstoffe in hohen Konzentrationen in Zeolith L eingelagert. Die Energie von Licht, das von einem der orientierten Farbstoffmoleküle im Kristall absorbiert wird, kann im Kristall schnell weiter diffundieren (Siehe Abbildung 3).

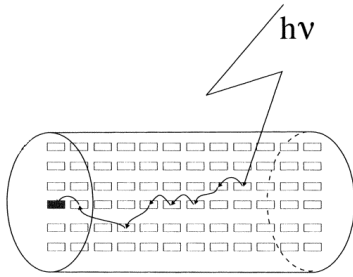


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines künstlichen Antennenkomplexes. Die Rechtecke stellen Farbstoffmoleküle dar. Die Energie von absorbiertem Licht kann im Kristall diffundieren. Aus [Gfeller1997].

2.1.1.4 Optische Schalter

Es wurden schon verschiedene optische Schalter auf der Basis von Wirt/Gast-Systemen realisiert [Wöhrle2001].

Es wurde gefunden, daß das Farbstoffmolekül Thionin im Zeolith Y verschiedene spektrale Positionen einnehmen kann [Ehr1994]. Bei Temperaturen von wenigen Kelvin können die beiden spektralen Zustände über deren Fluoreszenzspektren detektiert werden. Ein Vergleich mit Ergebnissen von Rietveld-verfeinerten Pulver-Röntgendiffraktogrammen des ähnlichen gebauten Methylenblaus legt nahe, daß innerhalb des großen Superkäfigs von Zeolith Y zwei räumliche Positionen existieren, die den beiden spektralen Positionen entsprechen könnten [Hoppe1994]. Auch quantenmechanische 'ab initio' Rechnungen zeigen diese beiden Positionen, die durch eine geringe Barriere voneinander getrennt sind [Müller1999] [Müller2000].

Abbildung 4 zeigt die beiden gefundenen Einbaulagen und die beiden spektralen Positionen von Methylenblau bzw. Thionin in der Faujasitstruktur.

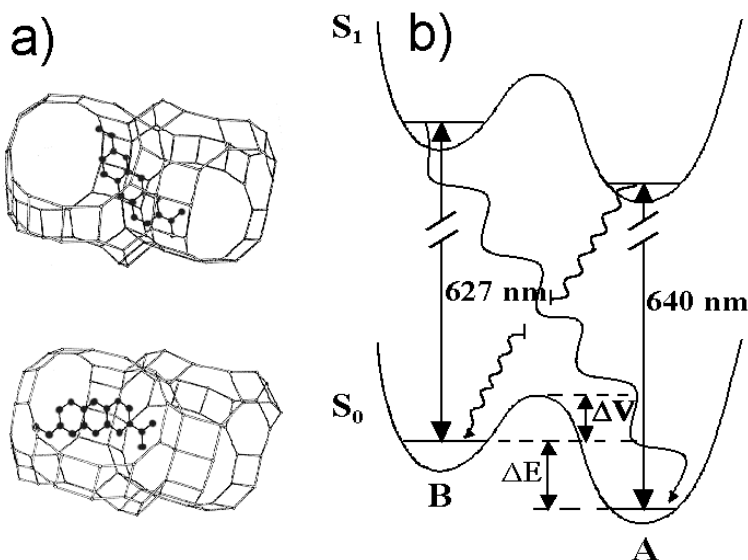


Abbildung 4: Einbaulagen a) und Termschema b) von Methylenblau/ Thionin in Faujasit [Ehr1994] [Hoppe1994].

In einem anderen Ansatz wird die Schaltstabilität eines photochromen Spiropyran-Farbstoffes durch den Einbau in einen Molekularsieb erheblich gesteigert [Schomburg2001].

Photoinduziertes Schalten von Azobenzol zwischen der Cis- und der Transform ist auch in den Poren von AlPO₄-5, ZSM-5 und Silikalit-1 (ZSM-5 aus reinem SiO₂) möglich. Untersuchungen an einzelnen Kristallen zeigen eine stark veränderte Doppelbrechung, die eine empfindliche Detektion der Schaltvorgängen erlaubt [Hoffmann1997].

Eine Übersicht über Photochemie in Zeolithen mit dem Ziel der Kontrolle von photochemischen Reaktionen aufgrund des supramolekularen Aufbaus von Wirt-Gast-Systemen bieten Scaiano und Garcia [Scaiano1999]. Eine aktuelles Verzeichnis bekannter photochemische Reaktionen und deren Produkte bietet die Internetseite des "Radiation Chemistry Data Center" [NDRL2001].

2.1.1.5 Sensoren

Durch eine Synthese von Nil Rot in der Porenstruktur von Faujasit ist es möglich, den Farbstoff fest im anorganischen Material zu verankern, ihn aber für kleine Moleküle zugänglich zu machen. Das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum dieses Farbstoffes reagiert empfindlich auf die Polarität des verwendeten Lösungsmittels. Dadurch entsteht ein Material, das als Sensor für Lösungsmittel und deren Dämpfe verwendet werden kann [Meinershagen1999]. In regelmäßig aufgebauten dreidimensionalen Porensystemen aus Makroporen, die die Größe der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes besitzen, können vom Brechungsindex des eingelagerten Lösungsmittels abhängige Farbeffekte erreicht werden [Blanford2001].

Andere Detektoren wurden auf der Basis von SnO₂ oder TiO₂-haltigen Molekularsieben für reduktive oder oxidative Gase und auf der Basis von Rhodamin Farbstoffen in MCM-41 zur Bestimmung von SO₂ realisiert [Wark2000] [Scott2001].

Eine konkrete Realisierung eines Feuchtigkeitssensors auf der Basis von ZSM-5 Kristallen ist in Scandella et al. [Scandella1998] beschrieben.

2.1.1.6 Molekulare Drähte

Es ist gelungen, molekulare Drähte, also isolierte eindimensionale Stränge eines leitenden Polymers, in mesoporösen Molekularsieben herzustellen [Wu1994]. Dazu wird in einem eindimensionalen mesoporösen Festkörper, Anilin zu dem elektrisch leitfähigen Polyanilin polymerisiert. Abbildung 5 zeigt schematisch den Aufbau des eindimensionalen elektrisch leitfähigen Polymers in einer hexagonalen Porenstruktur.

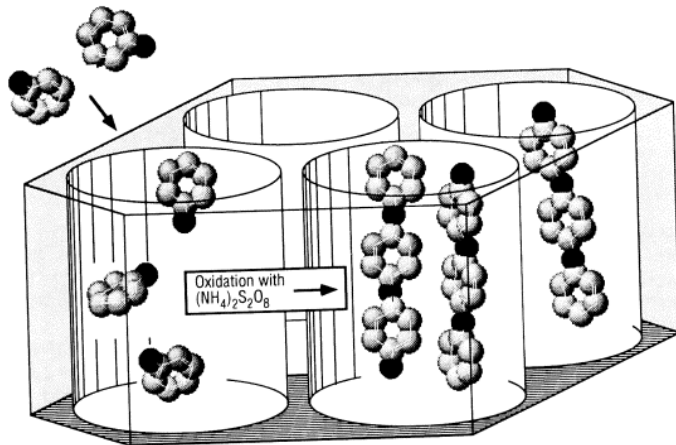


Abbildung 5: Aufbau eines eindimensionalen elektrisch leitfähigen Polymers in einer eindimensionalen Porenstruktur. Aus [Wu1994].

Durch die Pyrolyse des organischen Tripropylamin Templats in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ ist es möglich, innerhalb der Poren sehr dünne Kohlenstoff-Nanoröhren mit etwa 0,4 nm Durchmesser herzustellen [Wang2000]. An diesen Kohlenstoffröhren konnten die polarisationsabhängigen Absorptionsspektren erklärt [Li2001] und elektrische Leitfähigkeit nachgewiesen [Tang1998] werden.

2.1.2 Variationsmöglichkeiten

Eine Kombination aus verschiedenen Effekten beschreibt die Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast. Sowohl am Wirt, als auch am Gast, können diese Effekte mit chemischen Methoden variiert werden. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen beispielhaft die Variationsmöglichkeiten der Größe, der Form und der Polarität am Gast und am Wirt.

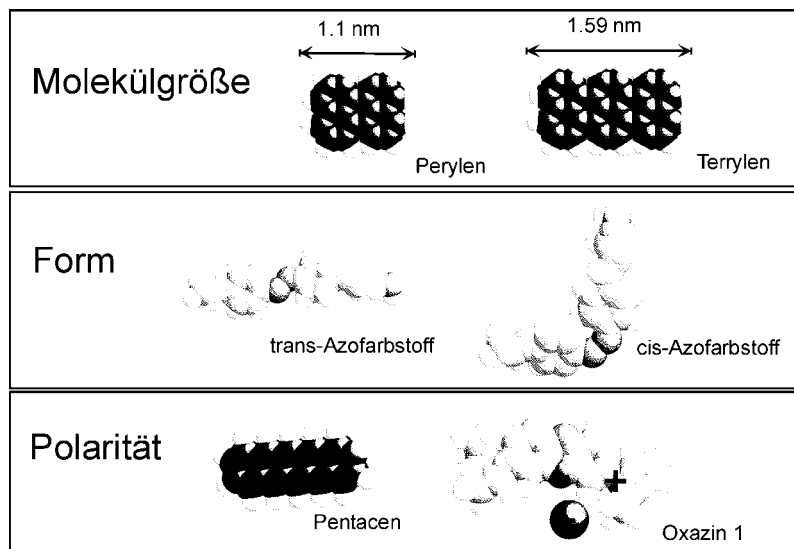


Abbildung 6: Chemische Variationsmöglichkeiten an der Porenstruktur.

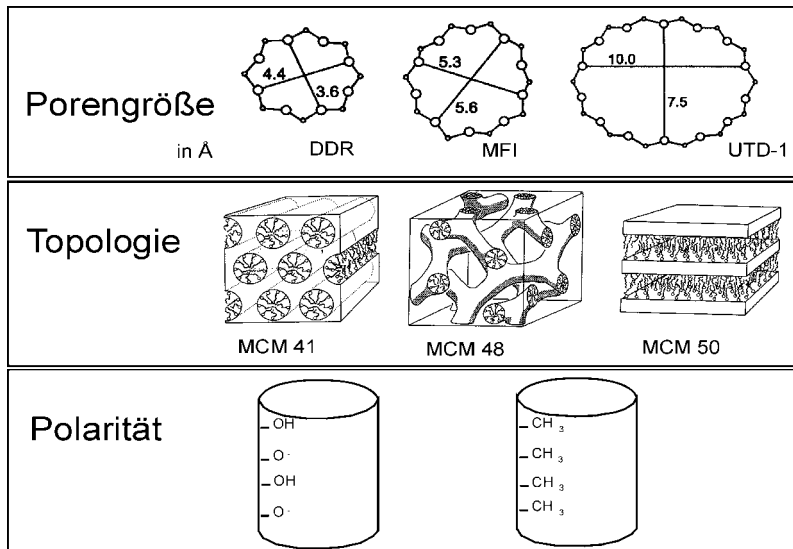


Abbildung 7: Chemische Variationsmöglichkeiten an den Gastmolekülen.

Die wohl entscheidendste Variationsmöglichkeit ist die nahezu beliebige Anpassung der Porengröße. Es existieren stabile Porengerüste mit Porengrößen, die von der Einlagerung eines kleinen He-Atom (ca. 0,2 nm) bis hin zu Polymeren von weit über 10 nm reichen. Ab einer Porengröße von etwa 2 nm wird jedoch keine definierte Wandstruktur mehr erreicht, so daß die Wände nur mehr aus amorphem Material bestehen. Nach IUPAC werden Festkörper mit einem Porendurchmesser unter 2 nm als mikroporöse Materialien und Festkörper mit einem Porendurchmesser von 2 bis 50 nm als mesoporöse Materialien bezeichnet [McCusker2001]. Unter den nanoporösen Festkörpern wird im Allgemeinen ein Material mit Poren in der Größenordnung von einem nm (etwa 0,5 bis 5 nm) bezeichnet. Abbildung 8 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Porengrößen und darin passende Gastmoleküle.

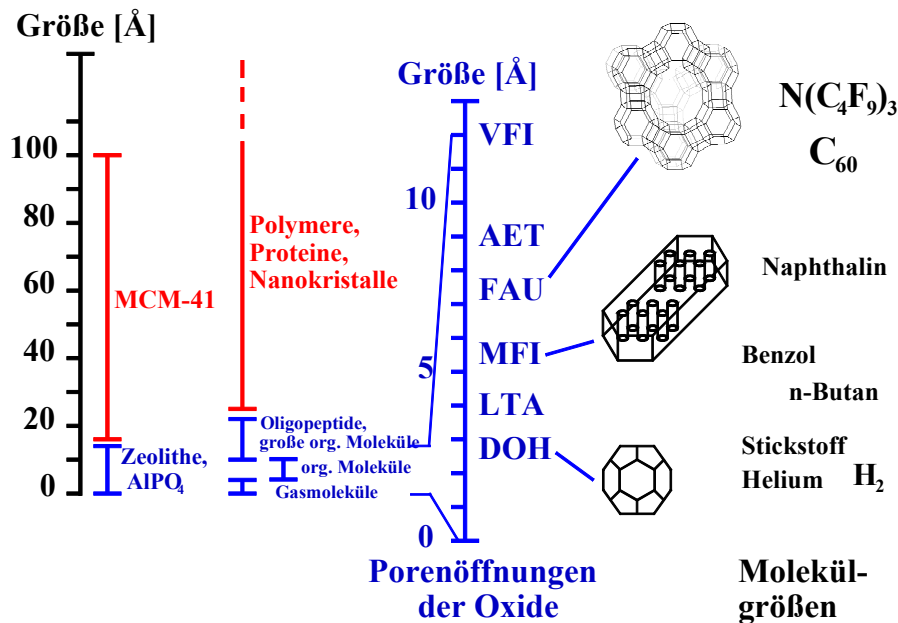


Abbildung 8: Überblick über die bei nanoporösen Materialien zugänglichen Porengrößen sowie typischen Gastmolekülen. Auf der rechten Seite ist der Bereich der Mikroporen vergrößert dargestellt. Aus [Schüth1995].

2.1.3 Ziele: Molekulare Funktionen

Durch verschiedene Strategien sollen Funktionen durch die Einlagerung von Farbstoffen in die Wirtsstruktur erzeugt werden:

- Die dreidimensionale, wohldefinierte Fixierung von funktionstragenden Molekülen (Ventil, Schalter)
- Die Ausnutzung von Wirt/Gast Wechselwirkungen (Rotor, Schalter)
- Die Ausnutzung der Porenstruktur und Größe (Ventil, Gefäß).

Mittels der optischen Einzelmolekülspektroskopie sollen anschließend die Funktionen einzelner Farbstoffmoleküle in der Wirtsstruktur untersucht werden.

2.1.3.1 Schalter

Ein Ziel der Einzelmolekülspektroskopie ist es, Informationen mit der Hilfe eines Moleküls zu speichern. Zu diesem Zweck müssen mindestens zwei stabile Zustände des Moleküls vorhanden sein. Ideen für die Realisierung eines optischer Schalters sind in Abbildung 9 skizziert.

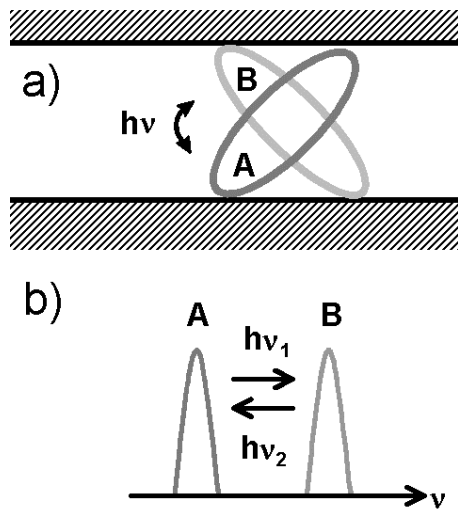


Abbildung 9: Einzelnes Farbstoffmolekül als optischer Schalter. a) Änderung der Orientierung und damit der Richtung des Übergangsdipolmoments, b) Änderung der Übergangsenergie.

Dabei werden zum einen die Eigenschaften des gerichteten Übergangsdipolmoments eines Farbstoffmoleküls und der damit verbundenen Polarisation des Lichts ausgenutzt. Kann die Orientierung des Farbstoffmoleküls definiert ausgerichtet und der Orientierungswinkel auf $\pm 2^\circ$ bestimmt werden, so könnten prinzipiell pro Molekül sogar bis zu 90 verschiedene Informationen gespeichert werden. Durch die Einlagerung in nanoporöse Festkörper kann dem Farbstoffmolekül eine solide Umgebung vorgegeben werden und aufgrund der vielfältigen Variationsmöglichkeiten von Gast und Wirt (siehe Abschnitt 2.1.2) die Schaltenergie optimal angepaßt werden.

Ein anderes Konzept ist die Ausnutzung von spektralen Änderungen des Farbstoffmoleküls. Dazu kann, wie in Abbildung 9 b dargestellt, in zwei verschiedenen Spektren A/B jeweils eine 0 oder 1 gespeichert werden. Auf dieser Basis wurden bereits Schalter konstruiert (siehe Kapitel 2.1.1.4). Auf der Basis eines einzelnen Moleküls kann von Terrylen in einem p-Terphenyl Kristall die Änderung der Anregungsspektren bei Tieftemperaturen detektiert werden [Kulzer1997]. Hierbei ändert sich in der näheren Umgebung des Farbstoffmoleküls die Konformation eines p-Terphenyl Moleküls, was zu einer definierten Änderung der Absorptionsfrequenz um 0,947 nm führt.

2.1.3.2 Ventil / Gefäß

Einige Farbstoffmoleküle können unter dem Einfluß von Licht erheblich die Form ändern. Dadurch ist es möglich, die Diffusionseigenschaften in Poren gezielt zu beeinflussen. So können zum Beispiel Bereiche in einem porösen Festkörper verschlossen werden, um dadurch extrem kleine Gefäße herzustellen. Abbildung 10 zeigt das Funktionsprinzip eines optisch adressierbaren Ventils in einer eindimensionalen Pore.

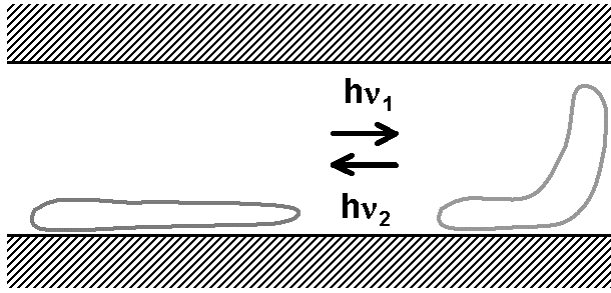


Abbildung 10: Einzelnes Farbstoffmolekül als optischer Verschluss oder Ventil. Links offener Zustand, Rechts geschlossener Zustand.

Durch solche adressierbare Schalter ist zum Beispiel der Diffusionsweg eines einzelnen Moleküls durch die Porenstruktur steuerbar. Bekannte Farbstoffe, die ihre Konformation durch Licht ändern, sind die Spiropyrane [Levy1988] und die Azofarbstoffe [Rau1990]. Makroskopisch wurde dieses Prinzip bereits durch die cis-trans Isomerisierung von Azobenzol in Molekularsieben realisiert [Hoffmann1997].

2.1.3.3 Rotor

Die Drehbewegung eines einzelnen Moleküls innerhalb einer Pore kann für verschiedene Funktionen eingesetzt werden. Abbildung 11 zeigt das Funktionsprinzip eines drehbaren Moleküls in einer Pore.

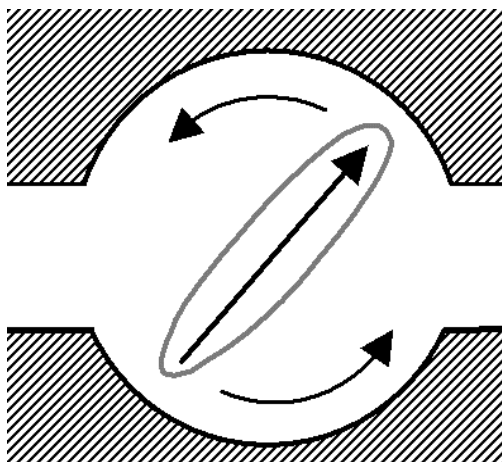


Abbildung 11: Einzelnes Farbstoffmolekül drehbar in einer Pore.

Die Drehung eines einzelnen Farbstoffmoleküls kann gut mit der Einzelmolekülspektroskopie beobachtet werden. Für die kontrollierte Erzeugung einer Drehbewegung in eine Richtung stehen mehrere Konzepte zur Verfügung. Zum einen kann durch ein äußeres elektrisches Feld ein Farbstoffmolekül, das ein permanentes Dipolmoment besitzt, ausgerichtet werden. Dieses elektrische Feld könnte auch mit einem intensivem Lichtfeld erzeugt werden (optischer Kerreffekt) [Schwarz1999]. Eine andere Möglichkeit ist die Ausnutzung der thermischen Eigenbewegung des Moleküls bei

Raumtemperatur. Durch Zuführen von Energie in Form von "farbigem" Rauschen kann eine Brownsche Drehung in nur einer Richtung erreicht werden. Abbildung 12 zeigt, wie Brownsche Diffusionsbewegung in einen gerichteten Materialtransport verwandelt werden kann [Bartussek1995].

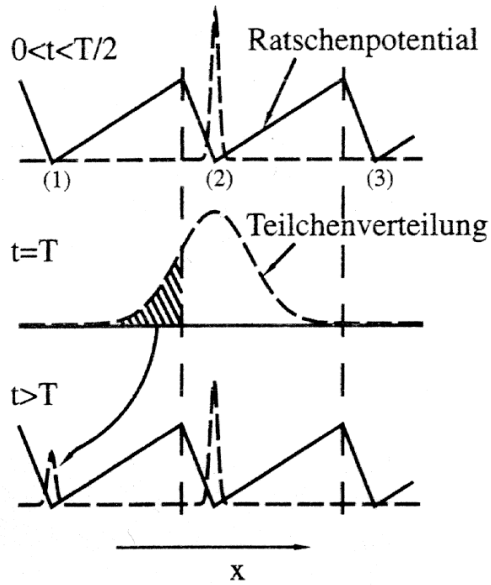


Abbildung 12: Schematische Darstellung wie aus der Oszillation eines asymmetrischen Ratschenpotentials ein Materialtransport realisiert werden kann. Start (oben) eingeschaltetes Ratschenpotential, die Teilchen sammeln sich in Minimum (2); ausgeschaltetes Potential (mitte), die Teilchen diffundieren in beide Richtungen los; wieder eingeschaltetes Potential (unten), die Teilchen, die nach links diffundierten, sind über den Berg gekommen, die nach rechts diffundierten werden zurückgeholt. Aus [Bartussek1995].

Der zweite Hauptsatz der Thermodynamik wird dabei natürlich nicht verletzt, da zum zeitlich passenden Ein- und Ausschalten des Ratschenpotentials Energie benötigt wird.

2.1.3.4 Fluoreszenzpolarisation einzelner Kristalle

Der orientierte Einbau von Farbstoffmolekülen in die eindimensionalen Poren eines Festkörpers ist für Photonische Kristalle von entscheidender Bedeutung (siehe Abschnitt 2.1.1.1). Ein Experiment mit überraschenden Ergebnissen untersucht die Polarisationsrichtung der abgestrahlten Fluoreszenz der Farbstoffe Oxonin und Pyronin aus einzelnen Zeolith L Kristallen [Megelski2001]. Die experimentellen Ergebnisse zeigen eine Verkippung des Übergangsdipolmoments um $\alpha = 72^\circ \pm 3^\circ$ gegenüber der Porenrichtung. Abbildung 13 zeigt schematisch die Orientierungen der Übergangsdipolmomente, die aufgrund der 6-fachen Symmetrie des Kristalls gleichmäßig in 6 Richtungen aufgeteilt sind.

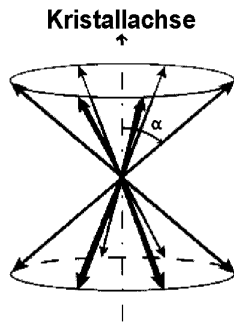


Abbildung 13: Räumliche Orientierungen der Übergangsdipolmomente in Zeolith L. (aus [Megelski2001]).

Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu der Tatsache, daß das Übergangsdipolmoment entlang der langen Molekülachse der untersuchten Farbstoffmoleküle liegt, da Rechnungen zeigen, daß für eine Einlagerung in die Pore unter dem ermittelten Winkel von 72° kein Platz vorhanden ist. Als Erklärung wird eine Beimischung des quer zum Molekül liegenden Übergangsdipolmoments aufgrund von starken elektrischen Feldern im Kristall herangezogen.

2.2 Vorteile von Messungen an einzelnen Molekülen

Obwohl Untersuchungen an einzelnen Molekülen experimentell viel aufwendiger sind als die Messung an vielen Molekülen (sogenanntes Ensemble), können einige physikalische Größen nur durch die Betrachtung der einzelnen Moleküle ermittelt werden. Es sind dies diejenigen Prozesse, bei denen durch die Mittelung über viele Moleküle das individuelle Verhalten verloren geht und nur der Mittelwert erhalten wird. Als anschauliches Beispiel soll je eine Handvoll weißer und schwarzer gleichartiger Sand zusammen gemischt werden. Es ist nun nicht möglich, dieses graue Gemisch von grauen oder einem Gemisch aus mehreren verschiedenen hellen Sandkörnern zu unterscheiden, ohne mit einem Mikroskop die Mischung aufzutrennen. Durch die Spektroskopie individueller Farbstoffmoleküle kann so die Verteilung der meßbaren Parameter von Ort, Orientierung, Anregungs- und Fluoreszenzenergie und dynamischem Verhalten bestimmt werden. Die Untersuchungen sind auf diese 4 Parameter beschränkt, da das Licht, mit dem die Messungen durchgeführt werden, durch die 4 Parameter Richtung, Polarisation, Energie und Zeit vollständig bestimmt ist.

Zeitliche Änderungen (Dynamik) im Verhalten von Molekülen können, wenn sie nicht von außen synchronisiert werden, überhaupt nicht an einem Ensemble von Molekülen detektiert werden. Als anschauliches Beispiel soll eine Großstadt bei Nacht dienen. Von der Ferne betrachtet, ist nur die Gesamtheit bestimmbar. Die Dynamik, mit der die einzelnen Lichter ein und ausgeschaltet werden, bleibt diesem Betrachter verborgen. Auch manche Farbstoffmoleküle zeigen ein ausgeprägtes Blinkverhalten, dessen Ursachen bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind. Bekannte Ursachen für diese Fluktuationen sind Dunkelzustände, wie sie zum Beispiel durch die Besetzung des Triplett-niveaus hervorgerufen werden [Kulzer1999] oder spektrale Diffusion, bei der die Anregungsenergie des Farbstoffmoleküls variiert [Blum2001].

2.3 Verschiedene bisher realisierte Experimente

2.3.1 Änderungen der Fluoreszenzspektren einzelner Moleküle

Durch die Aufnahme vieler Fluoreszenzspektren eines einzelnen Moleküls kann die Dynamik des elektronischen Übergangs untersucht werden. Erste Untersuchungen wurden von Lu et al. [Lu1997] an Sulphorhodamin 101 durchgeführt. Dafür wurden im Zeitabstand von 170 ms einige 100 Fluoreszenzspektren bis zum Photobleichen des Moleküls aufgenommen. Die Analyse mittels der Autokorrelationsfunktion des Schwerpunkts zeigt zwei verschiedene Raten, mit denen sich die Fluoreszenzspektren ändern. Eine intensitätsabhängige Untersuchung zeigt, daß die schnelle Rate ($\sim 2\text{s}^{-1}$) thermisch induziert ist, die langsame Rate (0,02 bis $0,5\text{ s}^{-1}$) dagegen etwas von der Anregungsleistung abhängig ist.

Untersuchungen an dem Farbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) zeigen, daß die spektralen Änderungen zunehmen, wenn das Farbstoffmolekül an ein Subfragment des Proteins Myosin angebunden wird [Wazawa2000].

Untersuchungen an DiIc_{12} auf Glas zeigen zwei fluoreszierende Zustände [Weston1998]. Dafür wurden wenige Fluoreszenzspektren im Abstand von 60 s aufgezeichnet.

In einer anderen Arbeit [Blum2001] wurden im Zeitabstand von 1 s jeweils einige hundert Fluoreszenzspektren von einzelnen Perylendiimid Farbstoffen gemessen. Die Fluoreszenzspektren haben eine deutliche Schwingungsstruktur und erlauben damit eine detaillierte Analyse von Änderungen der Schwingungsenergien und deren Franck-Condon Faktoren. Drei Modelle werden vorgestellt, die Änderungen im Fluoreszenzspektrum erklären. Abbildung 14 zeigt die drei möglichen Änderungen der elektronischen und vibronischen Übergänge.

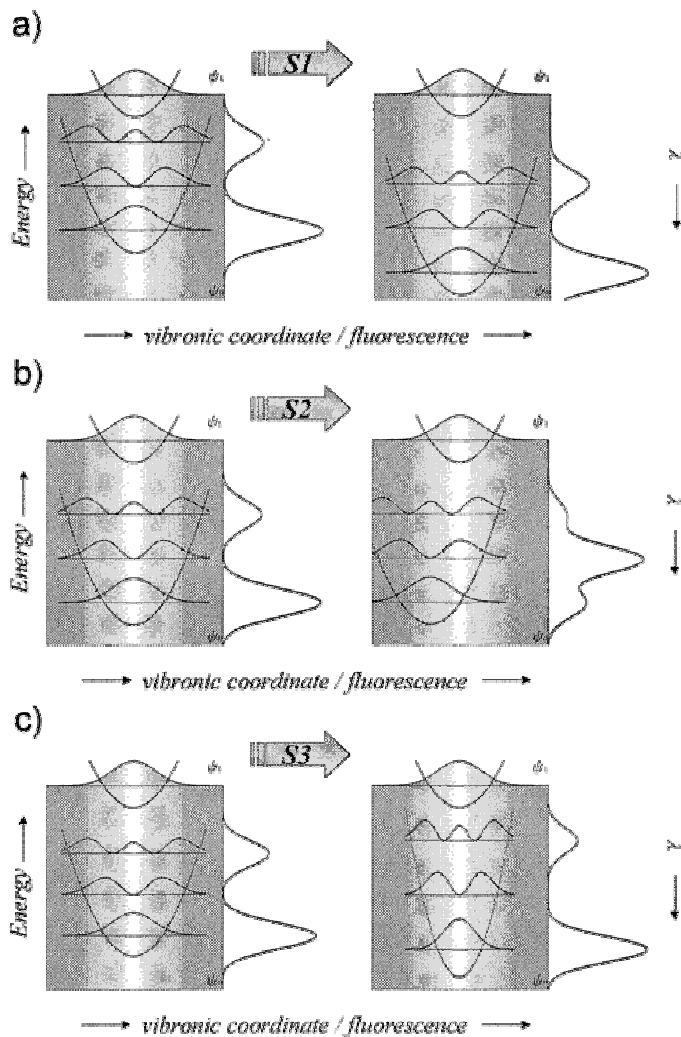


Abbildung 14: Drei Mechanismen, die zu geänderten Fluoreszenzspektren führen. Die Mechanismen S1 und S2 sind auf eine veränderte relative Lage der elektronischen Niveaus zurückzuführen. Bei dem Mechanismus S3 ändern sich die Schwingungsenergien, was bisher nicht beobachtet wird. (Aus [Blum2001])

Der Mechanismus S3, bei dem sich die Schwingungsenergien ändern, wird bisher nicht beobachtet. Die Mechanismen S1 und S2 beschreiben die relative Lage der elektronischen Niveaus (Fluoreszenzenergie und Schwingungskopplung) und werden auch bei der Auswertung von Fluoreszenzspektren in Kapitel 4.8 verwendet.

2.3.2 Orientierung einzelner Moleküle und deren Änderungen

Die Bestimmung des Übergangsdipolmoments und damit der Molekülorientierung, kann über die Polarisation des Anregungslichtes oder des Fluoreszenzlichtes erfolgen. Bei der Aufspaltung des Fluoreszenzlichtes in die zwei Polarisationsrichtungen kann zwar eine sehr gute Zeitauflösung erreicht werden, es sind jedoch zwei Lösungen möglich, wodurch die absolute Lage des Übergangsdipolmoments nicht bestimmt werden kann. Ein Problem stellt auch die mögliche Ausrichtung des Übergangsdipolmoments in z (entlang der optischen Achse) dar. Bei der Methode der Aufspaltung in zwei Polarisationsrichtungen kann hierbei ein erheblicher Fehler auftreten, da die z-Polarisation vom Mikroskopobjektiv relativ gut eingesammelt werden kann [Ha1999]. Aus dem Fluoreszenzsignal kann

auch die Orientierung direkt bestimmt werden, wenn außerhalb des Fokus das Emissionsmuster abgebildet und dessen Form analysiert wird [Bartko1999].

Die alternative Methode, bei der die Anregungspolarisation geändert wird, kann den Winkel (der xy-Projektion) eindeutig bestimmen, und ist nicht so störanfällig aufgrund unbekannter z-Orientierung, da die z-Polarisation der Anregung normalerweise sehr gering ist [Ha1999]. Durch den Einsatz geeigneter Blenden, die eine starke z-Polarisation erzeugen, kann auch die z-Orientierung mit einem konfokalen Mikroskop bestimmt werden [Sick2000].

Eine detaillierte aktuelle Untersuchung von DilC_{18} Molekülen in dünnen Polymerschichten beschreiben Weston et al. [Weston2001]. Darin wird mit einer Zeitauflösung von 32 ms und einer Winkelbestimmungsgenauigkeit von etwa 2° die Reorientierung von einzelnen Molekülen beobachtet. Es werden keine kontinuierlichen Umorientierungen, sondern nur plötzliche Sprünge der Orientierung beobachtet. Die Sprungrate wird in Abhängigkeit von dem Polymer, der Polymerfilmdicke und der Anregungsleistung untersucht. Als Ergebnis wird bei dünneren Polymerschichten eine erhöhte Beweglichkeit der Moleküle beobachtet. Die Glastemperatur verschiedener Polymere hat jedoch nur einen geringen Einfluß. Interessant ist eine erhöhte Beweglichkeit bei erhöhter Anregungsleistung. Diese kann aber sowohl durch eine photoinduzierte Dynamik, als auch durch thermisches Aufheizen des Materials erklärt werden.

2.3.3 Fluoreszenzdynamik

Durch die Analyse der Änderungen in der Fluoreszenzintensität können dynamische Prozesse analysiert werden, die einen Einfluß auf die Helligkeit des einzelnen Moleküls besitzen. Auf diese Weise sind die Raten des Triplettzustandes und anderer Dunkelzustände ermittelbar. Im Versuch wird entweder direkt der Verlauf der Fluoreszenzintensität mit möglichst hoher Zeitauflösung aufgezeichnet, oder es wird die Fluoreszenzautokorrelationsfunktion $g^2(\tau)$ berechnet, die alle statistisch relevanten zeitlichen Änderungen enthält. Der Vorteil der Autokorrelationsfunktion besteht in einer erheblichen Verringerung des Datenaufkommens, das bei einer logarithmisch gewählten Zeitachse mit wenigen hundert Zahlen auskommt. Für die genaue Speicherung einer Zeitspur mit μs Zeitauflösung können dagegen fast 1 Milliarde Datenpunkte anfallen (z.B. 10^9 Photonen oder 1000 Sekunden Zeitspur). Moderne Rechenanlagen können mittlerweile diese Datenmengen gut verarbeiten, wodurch die Speicherung der Zeitspur vorteilhaft wird. Der Informationsvorteil der Zeitspur besteht in der Freiheit, den Zeitbereich zu wählen, aus dem die Dynamik analysiert wird. In der Fluoreszenzautokorrelationsfunktion ist nur der Mittelwert der gesamten Messung enthalten. Bei Bedarf kann aus jedem beliebigen Abschnitt der Zeitspur nachträglich die Autokorrelation berechnet werden. Durch Bildung von Histogrammen aus den Längen der An- und Auszeiten des Moleküls ist es möglich, die Triplettzerfallsrate k_{31} direkt aus den Auszeiten, und die Intersystemcrossingrate k_{23} durch Abschätzung der Anregungsrate k_{12} aus den Anzeiten zu ermitteln [Kulzer1999] [Ha1997] (siehe auch Kapitel 4.4.2).

Auch aus einem Fluoreszenzabstandshistogramm, bei dem nur der zeitliche Abstand aufeinanderfolgender Fluoreszenzphotonen aufgezeichnet wird, kann im nachhinein die Autokorrelationsfunktion berechnet werden [Fleury2000] [Lounis2000]. Auf diese Weise sind von Terrylen in p-Terphenyl die Intersystemcrossingrate $k_{23} \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ und

die Tripletzerfallsrate $k_{31} \sim 10^3 \text{ s}^{-1}$ bestimmt worden [Fleury2000]. An Molekülen, die mit dem Triplettsauerstoff in Kontakt kommen, kann die Tripletzerfallsrate mit $k_{31} \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ jedoch erheblich schneller sein [Tinnefeld2001].

2.4 Diffusion

2.4.1 Statistik und molekulare Beschreibung von Diffusion

Die Diffusion eines Moleküls ist auch auf molekularer Basis erklärbar. In der kinetischen Gastheorie besitzt jeder Freiheitsgrad die Energie $1/2 kT$. Die mittlere quadratische Translationsgeschwindigkeit in eine Raumrichtung ist daher:

$$\langle v^2 \rangle = \frac{k \cdot T}{m} \quad (1)$$

So hat zum Beispiel ein typisches Protein mit der molaren Masse 14000 g/mol bei Raumtemperatur eine mittlere Geschwindigkeit von 13 m/s. In Wasser diffundiert das Protein jedoch in einer Sekunde nur etwa 25 μm weit. Diese Diskrepanz kann dadurch beseitigt werden, daß das Protein in Wasser sich nur etwa $\delta = 10 \text{ nm}$ weit mit seiner hohen mittleren Geschwindigkeit in eine Richtung bewegen kann, bevor es nach etwa $\tau = 1 \text{ ps}$ durch einen Stoß mit den Lösungsmittelmolekülen die Bewegungsrichtung ändert. Im Ansatz zur eindimensionalen Herleitung des Diffusionsgesetzes wird nun angenommen, daß sich das Molekül zwischen zwei Stößen in der Zeit τ die Strecke δ mit gleicher Wahrscheinlichkeit nach vorne oder zurück bewegt hat [Berg1993]. Der wichtigste Parameter zur molekularen Beschreibung von Diffusionsprozessen, die mittlere quadratische Diffusionslänge $\langle x^2 \rangle$ kann allein aus diesen Annahmen berechnet werden:

$$\langle x^2 \rangle = t \frac{\delta^2}{\tau} \quad (2)$$

Die Stoßzeiten τ und die Schrittweite δ kann passend zum makroskopisch definiertem Fickschen Gesetz durch die Diffusionskonstante D ersetzt werden: $2 D = \delta^2/\tau$. Damit ergibt sich im eindimensionalen Fall eine mittlere quadratische Diffusionslänge von:

$$\langle x^2 \rangle = 2 \cdot D t \quad (3)$$

Wird die Diffusion in mehreren Dimensionen beobachtet ($r^2 = x^2 + y^2 + z^2$), so ist die mittlere quadratische Diffusionslänge für jede Dimension um $2 D t$ größer.

$$\langle x^2 \rangle = 4 \cdot D t \quad (2 \text{ dimensional}) \quad (4)$$

$$\langle x^2 \rangle = 6 \cdot D t \quad (3 \text{ dimensional}) \quad (5)$$

Wird von einer dreidimensionalen Diffusion nur eine zweidimensionale Projektion gemessen, so ist auch nur die zweidimensionale Beschreibung korrekt, da die z^2 Werte nicht berücksichtigt werden.

Berechnet man explizit die Wahrscheinlichkeit, wie oft das Molekül vorwärts bzw. rückwärts diffundiert ist, so erhält man aus der Binominalverteilung unter Verwendung der Stirlingschen Näherung für große Fakultäten eine Gaußverteilung:

$$P(x,t) dx = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} dx \quad (6)$$

Diese Gleichung ist in Abbildung 15 dargestellt.

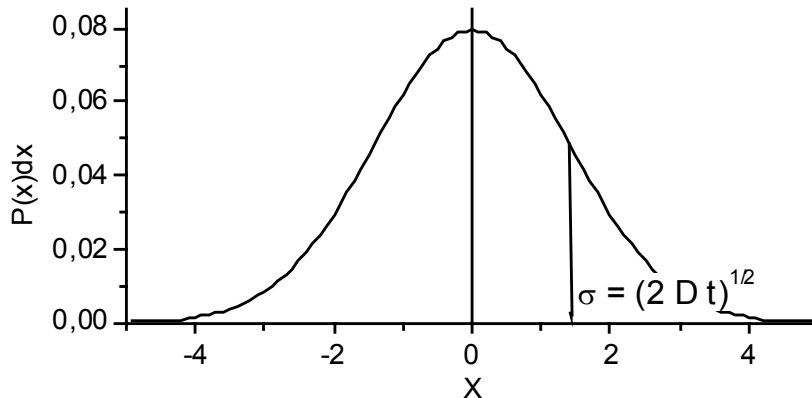


Abbildung 15: Aus Gleichung (6) berechnete Wahrscheinlichkeitsdichte ein Molekül mit $D = 1$ nach der Zeit $t = 1$ im Abstand x anzutreffen. Am Punkt σ ist die maximale Wahrscheinlichkeit auf $e^{-0,5} \sim 61\%$ abgefallen.

Der Graph zeigt die Wahrscheinlichkeitsdichte, ein Molekül nach der Zeit t im Abstand x anzutreffen. Am wahrscheinlichsten ist es daher, daß das Molekül wieder an seiner Ausgangsposition angetroffen wird. Die mittlere quadratische Diffusionslänge kann mit dem Quadrat der Standardabweichung σ identifiziert werden. Werden Experimente mit vielen Molekülen gemacht, so entspricht die Wahrscheinlichkeitsdichte der Konzentration. Ein Tintenfleck verbreitert sich demnach auf einem nassen Löschblatt gaußförmig nach Gleichung (6).

Die statistische Analyse von zweidimensionalen Trajektorien erfolgt analog der Methode von Schütz et al. [Schütz1997]. Dazu werden für ein Zeitintervall alle beobachteten quadratischen Diffusionslängen r^2 der Größe nach sortiert. Die Sortierung nach der fallenden Größe entspricht der Wahrscheinlichkeit das Molekül außerhalb des Abstandes r_1^2 anzutreffen. Die Berechnung dieser Wahrscheinlichkeitsverteilung ergibt (In der Formel (2) in [Sonnleitner1999] fehlt ein Minuszeichen im Exponenten):

$$P(r^2,t) dr^2 = \int_{r^2}^{\infty} \frac{1}{\langle r_1^2 \rangle} e^{-\frac{r_1^2}{\langle r_1^2 \rangle}} dr_1^2 = e^{-\frac{r^2}{\langle r^2 \rangle}} \quad (7)$$

Die sortiert angetragenen quadratischen Diffusionslängen werden mit einer abfallenden Exponentialfunktion angepaßt, und man erhält die mittlere quadratische

Diffusionslänge $\langle r^2 \rangle$ für dieses Zeitintervall. Treten mehrere verschiedene Diffusionsprozesse auf, können diese durch eine Summe von mehreren Exponentialfunktionen analysiert werden. Die Berechnung der Diffusionskonstante für normale Diffusion erfolgt nach dem linearen Zusammenhang zwischen mittlerer quadratischer Diffusionslänge $\langle r^2 \rangle$ und der Zeit t in Gleichung (4). Beispiele für diese Analyse sind in Kapitel 4.4.7 aufgeführt.

2.4.2 Makroskopische Theorie der Diffusion

Die makroskopische Theorie der Diffusion wird mit den beiden Fickschen Gesetzen beschrieben. Das erste Ficksche Gesetz beruht darauf, daß der Teilchenfluß J proportional zu einem Konzentrationsgefälle ist:

$$J = -D \frac{\delta c}{\delta x} \quad (8)$$

Die Proportionalitätskonstante D wird als Diffusionskonstante definiert. Das zweite Ficksche Gesetz ist eine Differentialgleichung und beschreibt den räumlichen Ausgleich der Konzentration mit der Zeit. Dieser Ausgleich ist proportional zur räumlichen Änderung des Konzentrationsgefälles.

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \cdot \nabla^2 c \quad (9)$$

Darin ist ∇^2 der dreidimensionale Laplaceoperator: $d^2/dx^2 + d^2/dy^2 + d^2/dz^2$. Je nach Geometrie und Anfangsbedingungen sind verschiedene Lösungen der Fickschen Gesetze möglich. Beim Auffinden der richtigen Lösungen für die Differentialgleichung kann auch Literatur über die Wärmeleitung in Festkörpern [Carslaw1959] herangezogen werden, da die Differentialgleichung der Wärmeleitung die gleiche Form hat:

$$\frac{\delta v}{\delta t} = \kappa \cdot \nabla^2 v \quad (10)$$

Einige einfache Fälle sollen hier kurz vorgestellt werden. Zur Bestimmung der Diffusionskonstante D wird aus mikroskopischen Fluoreszenzbildern der Konzentrationsverlauf aufgenommen und aus diesem die eindimensionale mittlere Diffusionslänge σ für verschiedenen Zeiten ermittelt. Da die Beobachtung der Eindiffusion entlang einer Raumkoordinate erfolgt, muß das Gesetz für eindimensionale Diffusion nach Gleichung (3) angewendet werden. So kann aus dem zeitlichen Verlauf der mittleren Diffusionslänge σ nach Gleichung (11) die Diffusionskonstante D ermittelt werden.

$$\sigma = \sqrt{2Dt} \quad (11)$$

Im folgenden werden die zeitlichen Konzentrationsverläufe für einige einfache Geometrien berechnet.

2.4.2.1 Punktförmiger Tropfen

Aus einer punktförmigen Quelle soll eine begrenzte Anzahl von Teilchen c_0 in alle Raumrichtungen diffundieren. Dieses Problem wird durch eine Gaußverteilung analog Gleichung (6) gelöst [Berg1993]:

$$c(r,t) = \frac{c_0}{(4\pi Dt)^{3/2}} e^{-\frac{r^2}{4Dt}} \quad (12)$$

2.4.2.2 Herausziehen einer Trennwand

Die flache Trennwand bei $x = 0$ zwischen zwei Räumen mit den Konzentrationen 0 und c_0 wird herausgezogen. Zu diesem Proben ist die Fehlerfunktion $\text{erf}(x)$ nötig [Berg1993].

$$c(x,t) = \frac{c_0}{2} \cdot \left(1 - \text{erf} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \right) \quad (13)$$

2.4.2.3 Eindiffusion in ebene Grenzfläche

Ein ebener Körper wird mit konstanter Konzentration c_0 versetzt. Dieses Problem ist dem Herausziehen einer Trennwand ähnlich, jedoch bleibt hier die Konzentration c_0 außerhalb des Körpers durch schnelle Nachdiffusion konstant [Carslaw1959]:

$$c(x,t) = c_0 \cdot \left(1 - \text{erf} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \right) \quad (14)$$

Diese Geometrie entspricht schon relativ gut dem Eindringen einer Farbstofflösung in ein großes Probenstück. Um den Eindiffusionsverlauf einer Messung auszuwerten, wird die mittlere Diffusionslänge σ ermittelt. Setzt man $\sigma = (2Dt)^{1/2}$ wird die mittlere Diffusionslänge für $c = c_0 \cdot (1 - \text{erf}(1/(2)^{1/2})) = 0.317 c_0$ erreicht. Abbildung 16 zeigt das Konzentrationsprofil bei der Eindiffusion in einen ebenen Körper.

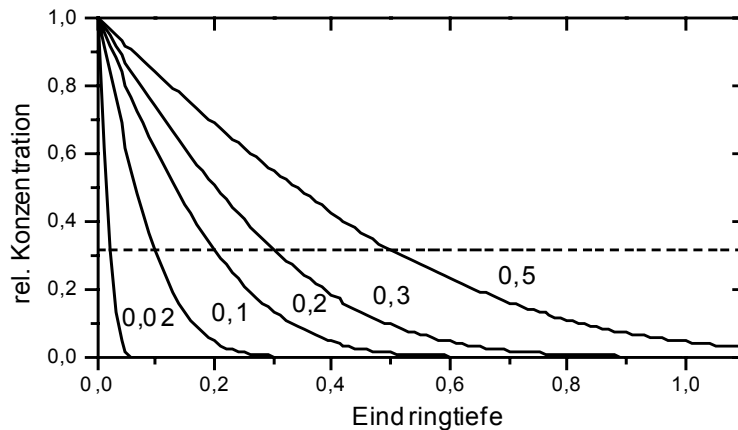


Abbildung 16: Konzentrationsverlauf des Eindiffundierens in einen ebenen Körper. Die Zahlen an den verschiedenen Kurven sind in Einheiten von $(2Dt)^{1/2}$ angegeben. Bei einer relative Konzentration von 0.317 gegenüber der Oberfläche entspricht die erreichte Eindringtiefe der mittleren Diffusionslänge σ .

Für die Auswertung der Eindiffusion wird die Eindringtiefe σ verwendet, bei der das Fluoreszenzsignal gegenüber der Oberfläche auf 31,7% abgefallen ist.

2.4.2.4 Eindiffusion in eine Kugel

Um die Abweichungen der Eindiffusion aufgrund einer dreidimensionalen Probenform abzuschätzen, wird auch das Eindringen in eine kugelförmige Probe berechnet. Die Kugel mit dem Radius a wird mit konstanter Konzentration c_0 versetzt. Das entsprechende Problem in der Wärmeleitung wurde für das Ansprechverhalten von kugelförmigen Thermometern genau untersucht [Carslaw1959] s.233.

$$c(r,t) = c_0 + \frac{2ac_0}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin\left(n\pi \frac{r}{a}\right) e^{-\frac{Dtn^2\pi^2}{a^2}} \quad (15)$$

Die Abbildung 17 zeigt verschiedene Eindringprofile, die durch Berechnung von 100 Summanden aus Gleichung (15) erhalten wurden.

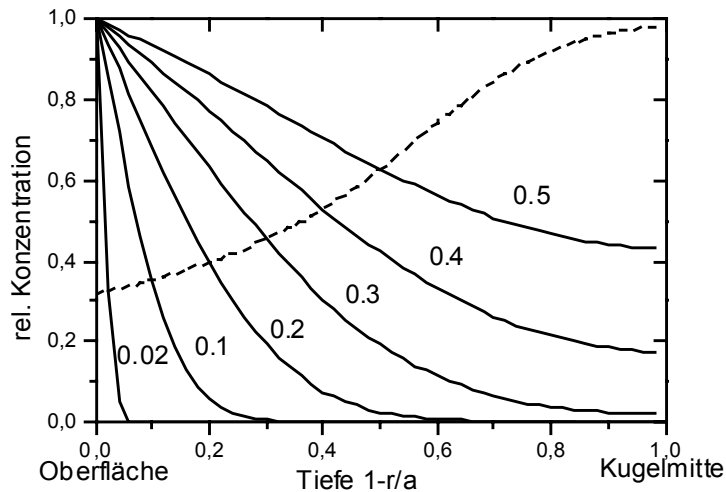


Abbildung 17: Konzentrationsverlauf des Eindiffundierens in eine Kugel. Die Zahlen an den verschiedenen Kurven sind in Einheiten der mittleren Diffusionslänge $(2Dt)^{1/2}$. Alle weiteren Parameter wurden 1 gesetzt. Die gestrichelte Kurve gibt diejenige Konzentration an, bei der die erreichte Eindringtiefe der mittleren Diffusionslänge entspricht.

Nur bei sehr kleinen mittleren Eindringtiefen $\sigma = (2Dt)^{1/2}$ hat sich bei der Verwendung von mehr als 5 Summanden das Ergebnis noch merklich verändert. Zur Bestimmung der mittleren Diffusionslänge kann hier kein konstantes Konzentrationsverhältnis gegenüber der Oberfläche angegeben werden. Nahe an der Oberfläche entspricht das Konzentrationsverhältnis noch dem Wert 0,317, wie bei der Eindiffusion in eine ebene Grenzfläche. Im Zentrum wird jedoch schneller eine höhere Konzentration erreicht. Bis zu einer etwa halb gefüllten Kugel sind jedoch die Abweichungen noch recht gering.

2.4.3 Weitere Methoden der Diffusionsmessung

Es sind verschiedene physikalische Methoden bekannt, um Diffusion experimentell zu messen. Neben PFG-NMR (Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonanz) [Kukla1996] und Neutronenstreuung werden überwiegend optische Verfahren eingesetzt. Die meisten optischen Methoden verwenden Fluoreszenzfarbstoffe als Sondenmoleküle. Beispiele hierfür sind FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FCS (fluorescence correlation spektroskopie) und SPT (single particle tracking). Bei FRAP wird lokal der Fluoreszenzfarbstoff mit einem starken Lichtpuls ausgebleicht und anschließend die Diffusion aus der Umgebung durch das Wiederansteigen des Fluoreszenzsignals beobachtet. In der FCS werden in einem sehr kleinen Detektionsvolumen die Fluoreszenzintensitätsfluktuationen aufgrund von ein- und ausdiffundierenden einzelnen Molekülen untersucht. Bei SPT wird in sehr verdünnten Lösungen der Weg eines einzelnen Teilchens aufgezeichnet und analysiert. Ist das Teilchen ein einzelnes Molekül, so bezeichnet man die Methode besser als SMT (single molecule tracking). Die drei Methoden sind jeweils für einen bestimmten Konzentrationsbereich und bestimmte Diffusionskonstanten optimal

geeignet. Einen Überblick über die Anwendbarkeit der verschiedenen optischen Methoden zeigt Abbildung 18.

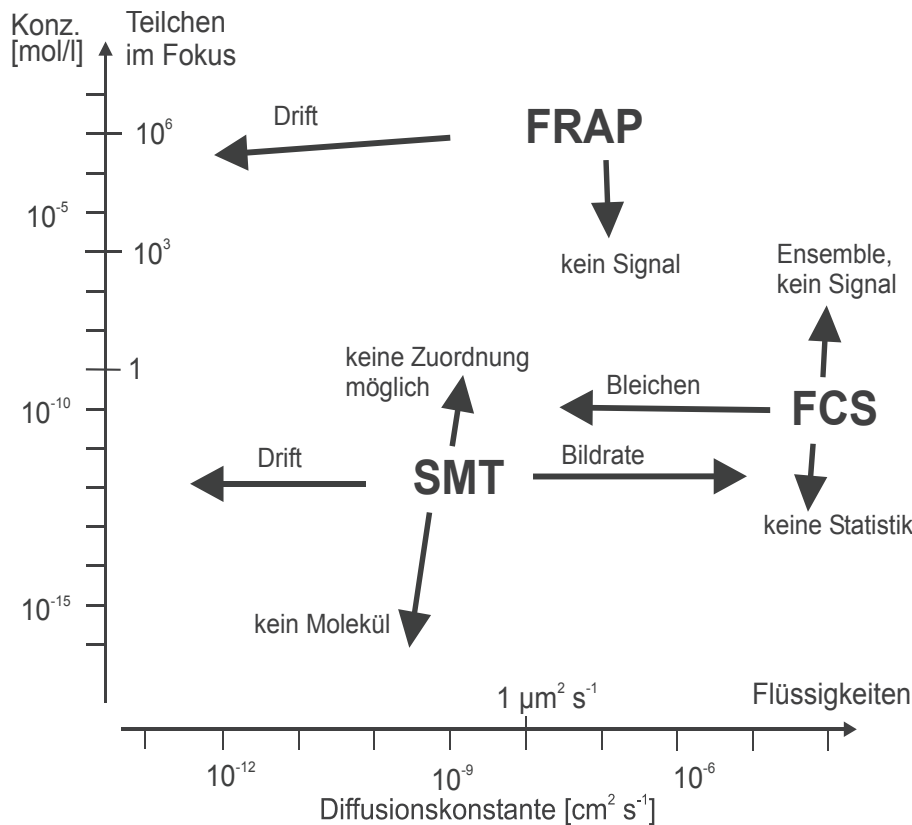


Abbildung 18: Anwendungsbereiche der verschiedenen fluoreszenzmikroskopischen Methoden zur Bestimmung von Diffusionskonstanten. Die Pfeile zeigen die Limitierungen der jeweiligen Methode an (siehe Text). Das optische Probenvolumen wird mit $\sim 10^{-15}$ Liter abgeschätzt.

Die verschiedenen Methoden sind aufgrund experimenteller Gegebenheiten auf einen bestimmten Bereich der Diffusionskonstanten und der Konzentration beschränkt:

Bei der Verwendung von FRAP muß ein kontinuierliches Wiederansteigen des Signals durch eine ausreichende Konzentration sichergestellt werden. Oberhalb einer Konzentration von $\sim 10^{-6}$ mol/Liter sind mindestens ~ 1000 Moleküle im Detektionsvolumen vorhanden. Ein typischer Drift der Apparatur von $1 \mu\text{m}$ pro Tag limitiert die Methode auf Diffusionskonstanten über $\sim 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Die FCS liefert nur dann ein Signal, wenn sich nur wenige Moleküle im Detektionsvolumen befinden. Viel mehr als 100 Moleküle sollten es nicht sein ($\sim 10^{-7}$ mol/Liter). Die Konzentration sollte aber auch nicht zu klein sein. In etwa 1/1000 der Meßzeit sollte sich ein Molekül innerhalb des Detektionsvolumens aufhalten, um in vernünftigen Zeiten eine gute Statistik in der FCS zu erhalten ($\sim 10^{-12}$ mol/Liter). Damit das Photobleichen der Farbstoffmoleküle die FCS-Messung nicht verfälscht, sollte die Verweilzeit im Detektionsvolumen nicht viel länger als eine Sekunde betragen. Um den Durchmesser des Detektionsvolumens von ca. $1 \mu\text{m}$ in einer Sekunde zu durchschreiten ist eine Diffusionskonstante von über $\sim 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ nötig.

Bei der Verfolgung eines einzelnen diffundierenden Moleküls mittels SMT darf die Konzentration, besonders bei großen Diffusionskonstanten, nicht zu groß sein, um das Abbild des Moleküls in folgenden Bild eindeutig zuzuordnen. Das bedeutet, daß sich im Detektionsvolumen maximal ein Molekül befindet ($\sim 10^{-9}$ mol/Liter). Bei geringen Konzentrationen ist die Methode nur etwa dadurch beschränkt, daß in einer ca. 100 μm großen Probe mindestens ein Molekül auffindbar ist ($\sim 10^{-16}$ mol/Liter). Aufgrund einer maximalen Bildrate von ca. 10 Bildern pro Sekunde ist die Methode auf kleine Diffusionskonstanten beschränkt; da sich ein Molekül nur etwa 1 μm weit verfolgen läßt, bevor es die optische Fokalebene verläßt ($\sim 10^{-7}$ cm^2/s). Wird nicht konfokal, sondern mit einem Flächendetektor abgebildet, vergrößert sich die Tiefenschärfe auf ca. 3 μm , und es sind bis zu 100 Bilder pro Sekunde möglich, wodurch sich Diffusionskonstanten bis $\sim 10^{-5}$ cm^2/s beobachten lassen. Ein typischer Drift der Apparatur von 1 μm pro Tag limitiert die Methode auf Diffusionskonstanten über $\sim 10^{-13}$ cm^2/s .

Obwohl die Methode des SMT auf einen relativ kleinen Bereich der Diffusionskonstante und der Konzentration beschränkt ist, sind mit ihr zusätzliche Informationen über den Diffusionsprozeß bestimmbar. So kann SMT z.B. zwischen speziellen Diffusionsarten wie anormaler Diffusion oder Transport unterscheiden [Saxton1997].

2.5 Mikroskopie

Die vier verschiedenen Methoden, die in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden, sollen hier kurz vorgestellt werden. Der Hauptunterschied liegt in der Geometrie der Anregung mit Licht. Abbildung 19 zeigt schematisch die vier verschiedenen optischen Mikroskopieverfahren.

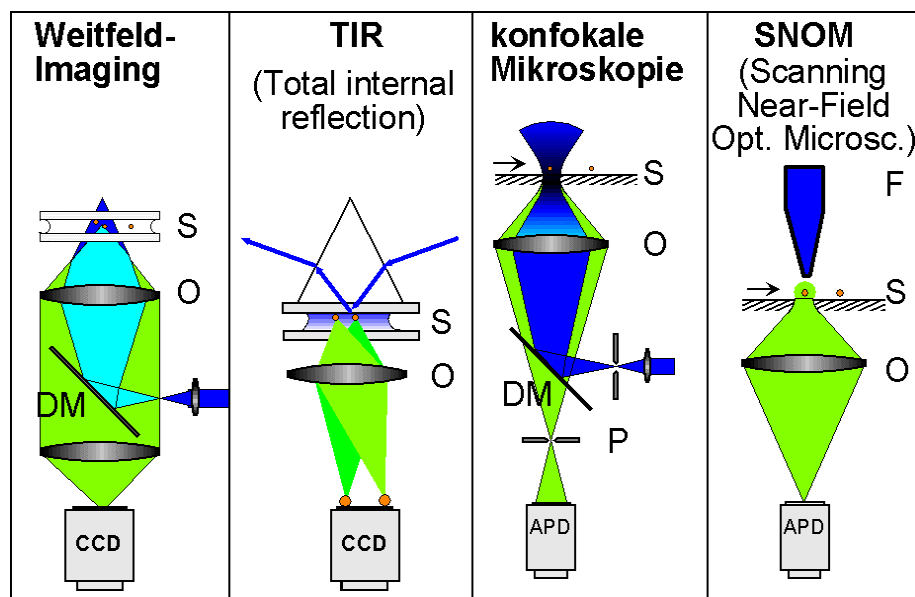


Abbildung 19: Verschiedene mikroskopische Verfahren. O: Objektiv, S: Probe, P: Lochblende, F: Glasfaser, DM: Farberteilerspiegel, CCD: Flächendetektor, APD: Punktdetektor. Aus [Jung2001].

Im normalen Weitfeldmikroskop wird die Probe gleichmäßig beleuchtet. Das Fluoreszenzlicht der Probe wird dann auf einen Flächendetektor (z.B. CCD-Kamera oder Auge) abgebildet. Der axiale Kontrast dieses Mikroskopes ist jedoch sehr gering, da das gesamte Fluoreszenzlicht, auch das außerhalb der Fokalebene, auf den Detektor gelangt.

In dem speziellen Fall der TIR-Anregung (totale interne Reflexion) kann es gelingen, nur die gewünschte Fokalebene zu beleuchten [Funatsu1995]. Dazu muß entlang der optischen Achse eine Änderung des Brechungsindex vorliegen, so daß Lichtstrahlen, die von der Seite eingestrahlt werden totalreflektiert werden. Von der Grenzfläche der Totalreflexion geht ein evaneszentes Feld aus, das etwa 0,1 Wellenlängen tief in die Probe eindringt. Dadurch werden nur die Farbstoffmoleküle in dem dünnen Bereich des evaneszenten Feldes angeregt. Bei der Verwendung von Objektiven mit einer sehr großen Numerischen Apertur kann auch ein Strahl am äußeren Rand des Objektivs zur Anregung verwendet werden [Ambrose1999].

In einem konfokalen Mikroskop wird zur Unterdrückung des Signals aus anderen Fokalebene ein möglichst kleiner Punkt der Probe bestrahlt [Pawley1995]. Nur dieser beleuchtete Punkt wird anschließend detektiert, wodurch ein sehr kleines Probenvolumen erreicht wird. Um jedoch ein Bild zu erhalten, ist es nun nötig, die Probe oder den Meßpunkt zu bewegen. Aufgrund der hohen axialen Auflösung können auch dreidimensionale Bilder der Fluoreszenzverteilung aufgenommen werden.

Eine noch besserer Auflösung wird erreicht, wenn die Probe durch ein optisches Nahfeld angeregt wird (SNOM oder NSOM: scanning near-field optical microscopy; optische Rasternahfeldmikroskopie) [Hecht2000]. Dazu wird Licht verwendet, das zum Beispiel aus einer sehr dünnen Spitze einer Glasfaser (~ 40 nm Öffnung) austritt. Dadurch kann ein sehr kleines Volumen nahe der Spitze beleuchtet werden. Da die Spitze jedoch sehr nahe an die Meßstelle gebracht werden muß, können nur Oberflächen untersucht werden.

Je nach Experiment haben die Methoden mit Flächendetektoren (CCD) oder mit Punktdetektoren (APD) Vorteile. Mit CCD-Flächendetektoren können sehr schnell aufeinanderfolgend Bilder aufgenommen werden, die Zeitauflösung eines Bildpunktes ist jedoch auf diese Bildrate beschränkt ($\sim 10^{-3}$ s). Bei der Verwendung von Punktdetektoren kann dagegen ein einzelner Bildpunkt mit einer sehr hohen Zeitauflösung ($\sim 10^{-9}$ s) untersucht werden. Das gesamte Bild muß jedoch gerastert werden, so daß große Bilder nur im Abstand von Sekunden möglich sind.

2.5.1 Optik im Mikroskop

2.5.1.1 Punktlichtquelle

Aufgrund der Wellennatur des Lichtes ist die Möglichkeit, Licht zu fokussieren, auf die Größenordnung der Wellenlänge beschränkt. Abbildung 20 zeigt die Geometrie einer Fokussierung mit den dafür relevanten Größen.

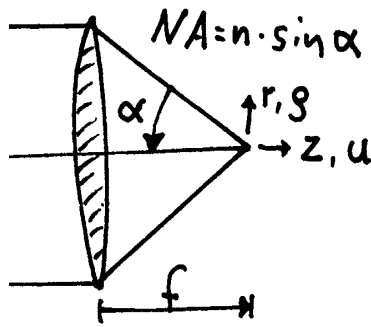


Abbildung 20: Definition des Öffnungswinkels α , der Brennweite f und der Koordinaten im Fokus r bzw. ρ und z bzw. u .

Die dreidimensionale Intensitätsverteilung eines fokussierten Lichtstrahles ist nicht einfach zu berechnen. Über die elektromagnetischen Beugungstheorie kann eine genaue Punktabbildungsfunktion (PSF = Point-spread-function) bestimmt werden [Richards1959] [Webb1996]. Die Rechnungen werden entweder nach dem Huygens-Fresnel Prinzip der kürzesten Wegstrecke [Hell1993] oder nach der Debye Näherung für eine große Fokallängen gegenüber der Wellenlänge [Török1995]. Die Unterschiede der beiden Methoden werden bei Egner et al. [Egner1999] diskutiert. In einer Näherung für nicht zu große Fokussierungswinkel ($\alpha < 45^\circ$) können die Intensitätsverteilungen entlang der optischen Achse (axial) nach Gleichung (23) und radial an der dünnsten Stelle des Strahls nach Gleichung (16) berechnet werden.

2.5.1.1.1 Radiale Intensitätsverteilung

Die radiale Intensitätsverteilung in einem fokussierten Lichtstrahl wird mit einer Besselfunktion erster Ordnung beschrieben.

$$I(\rho) = I_0 \left(\frac{2 \cdot J_1(\rho)}{\rho} \right)^2 \quad (16)$$

Hierbei ist ρ die dimensionslose radiale Ortskoordinate (in sogenannten radialen optische Einheiten) die über

$$r = \rho \frac{\lambda}{2\pi NA} \quad (17)$$

in die reale Ortskoordinate r umgerechnet werden kann. Abbildung 21 zeigt diese Besselfunktion, die sehr gut mit einer Gaußkurve nach Gleichung (31) angenähert werden kann.

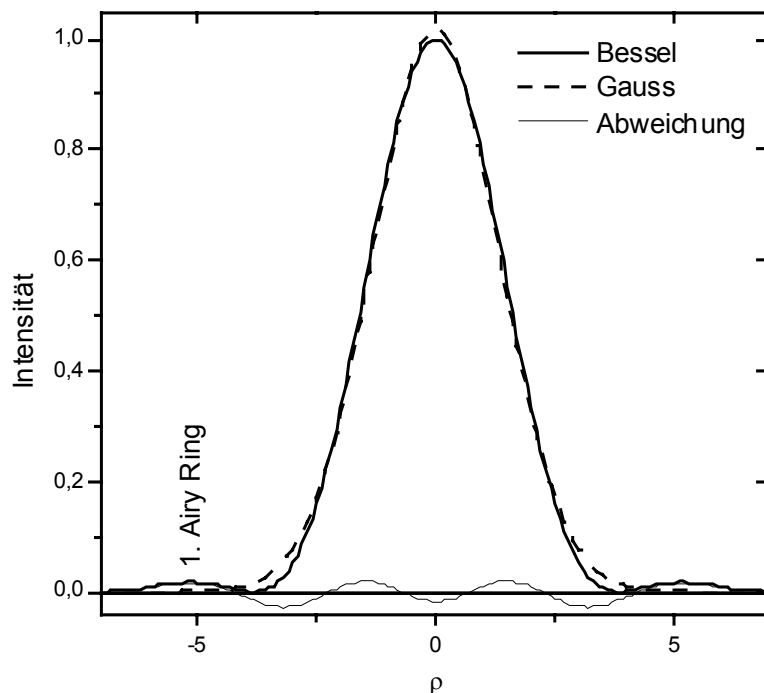


Abbildung 21: Radiale Intensitätsverteilung eines fokussierten Lichtstrahles. Eine Gaußkurve kann den Intensitätsverlauf gut beschreiben.

Die Halbwertsbreite der Funktion beträgt 3,1 radiale optische Einheiten was sich zu:

$$FWHM \approx \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA} \quad (18)$$

in realen Ortskoordinaten ausdrücken lässt. Das Auflösungsvermögen nach Rayleigh besagt, daß nur dann zwei punktförmige Lichtquellen getrennt voneinander aufgelöst werden können, wenn das Maximum außerhalb des ersten Minimums der Intensitätsverteilung liegt. Das erste Minimum der Airy Gleichung (16) liegt bei 3,83 radialen optischen Einheiten. In realen Einheiten ergibt sich hier der gängige Ausdruck des Auflösungsvermögens nach Rayleigh zu:

$$\Delta_{Rayleigh} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad (19)$$

Für manche Berechnungen ist die Flächenleistung im Zentrum des Fokus von Interesse. Dafür kann die gaußförmige Intensitätsverteilung in eine Stufenfunktion mit dem effektivem Radius r_{eff} ungerechnet werden. Es müssen die integralen Leistungen über die gesamte Fläche gleichgesetzt werden:

$$\int_0^{\infty} e^{\frac{-r^2}{2w^2}} 2r\pi dr = \int_0^{r_{eff}} 2r\pi dr \quad (20)$$

Als Lösung ergibt sich eine Vergrößerung des Radius auf:

$$r_{\text{eff}} = \sqrt{2} w \approx 1.41 w \quad (21)$$

Unter Berücksichtigung der Numerischen Apertur (Gleichung 4) und der Halbwertsbreite (32) ergibt sich ein effektiver Radius von:

$$r_{\text{eff}} = \frac{0,307 \lambda}{NA} \quad (22)$$

Die Abbildung 22 zeigt das radiale Intensitätsprofil für einen Gaußstrahl.

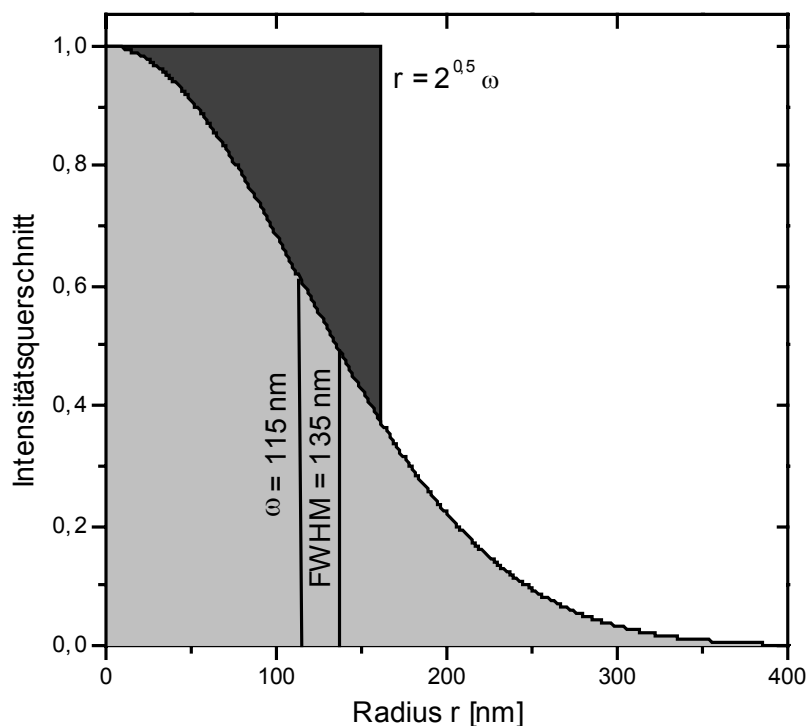


Abbildung 22: Wird die gaußförmige radiale Intensitätsverteilung (grau) mit einer Stufenfunktion (schwarz) angenähert, so ist genau dann in der Mitte des Fokus die gleiche Flächenleistung vorhanden, wenn der Radius der Stufenfunktion $2^{1/2}$ mal größer als der Gaußradius w nach Gleichung (31) gesetzt wird. (633 nm, NA. 1,3).

Die über die Fläche integrierte Lichtleistung, die angibt wieviel Licht außerhalb einer Blende mit dem Radius r abgeschnitten wird, besitzt genau denselben Verlauf wie das gaußförmige Intensitätsprofil. Dies bedeutet z.B., daß in Abbildung 22 innerhalb von $\text{FWHM} = 135 \text{ nm}$ die Hälfte der Gesamtlichtleistung vorhanden ist.

2.5.1.1.2 Axiale Intensitätsverteilung

Der Intensitätsverlauf entlang der optischen Ausbreitungsrichtung kann mit der Näherung für nicht zu große Fokussierungswinkel ($\alpha < 45^\circ$) mit einer speziellen Sinuskurve beschrieben werden:

$$I(z) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^2 \quad (23)$$

Hier ist u die dimensionslose axiale Ortskoordinate (in axialen optischen Einheiten), die über

$$z = u \frac{n \cdot \lambda}{2 \pi NA^2} \quad (24)$$

in die realen axialen Entfernungen z umgerechnet werden kann. Nach Wilson [Pawley1995] ist die Intensitätsverteilung auch für stärker fokussierte Strahlen verwendbar, wenn mit einer modifizierten axialen Ortskoordinate gerechnet wird:

$$z = u \frac{\lambda}{8 \pi n \cdot \sin^2(\alpha/2)} \quad (25)$$

Abbildung 23 zeigt die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse nach Gleichung (23).

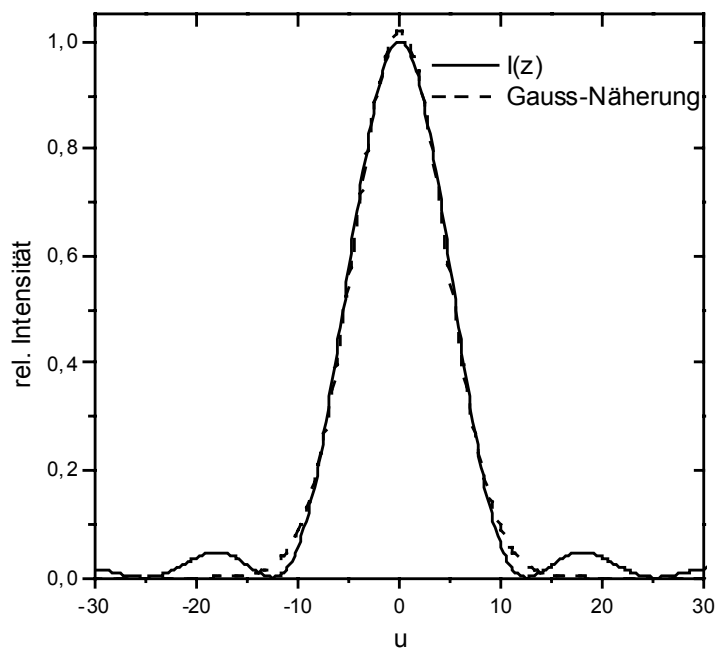


Abbildung 23: Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse nach Gleichung (23). Eine angepasste Gaußkurve nach Gleichung (31) mit $w = 4,52$ beschreibt den Kurvenverlauf der zentralen Intensität relativ gut.

Die Halbwertsbreite liegt bei etwa 10,6 axialen optischen Einheiten, wodurch sich nach Gleichung (25) die Halbwertsbreite in realen Koordinaten ausdrücken läßt:

$$FWHM_z = \frac{0,42 \cdot \lambda}{n \sin^2(\alpha/2)} = \frac{0,84 \cdot \lambda}{n - \sqrt{(n^2 - NA^2)}} \quad (26)$$

Bei der Verwendung der Näherung für kleine Numerische Aperturen nach Gleichung (24) ergibt sich:

$$FWHM_z \approx \frac{1,7 \cdot n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (27)$$

Für die Fokussierung von Lichtstrahlen mit gaußförmigen Intensitätsquerschnitt kann für kleine Fokussierungswinkel α eine einfache Gleichung für die dreidimensionale Intensitätsverteilung $I(r,z)$ angegeben werden [Mais2000] [Schwille1996] [Melles1999]:

$$I(r,z) = I_0 e^{\left(\frac{-r^2}{2 \cdot w(z)^2}\right)} \cdot \left(\frac{w_0}{w(z)}\right)^2 \quad (28)$$

$$w(z)^2 = w_0^2 + \left(\frac{\lambda}{2n\pi w_0} \cdot z\right)^2 \quad (29)$$

Hier ist w_0 der kleinste Radius des fokussierten Lichtes nach Gleichung (31). In dieser Darstellung besitzt die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse z jedoch ein Lorenz-Profil der Form $(1/(1+z^2))$ mit einer zu geringen Halbwertsbreite:

$$FWHM_L = \frac{w_0^2 \cdot 4n\pi}{\lambda} \approx 0,6 \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (30)$$

Verschiedene Gaußfunktionen

Die Gaußfunktion der lateralen Auflösung wird von Autor zu Autor verschieden verwendet. Drei verschiedene Definitionen sind häufig anzutreffen. Zum einen die klassische Gaußsche Glockenkurve, wie sie zur Berechnung der Normalverteilung in der Statistik verwendet wird, mit einer Breite von w , bei der die Kurve auf $e^{-0,5}$ abgefallen ist. Dieser Punkt wird auch als Streuung oder Wendepunkt bezeichnet.

$$I(x) = I_0 e^{-\frac{r^2}{2 \cdot w^2}} \quad (31)$$

Die Halbwertsbreite der Kurve kann aus:

$$FWHM = 2 \cdot \sqrt{\ln 4} \cdot w \approx 2,35 \cdot w \quad (32)$$

umgerechnet werden. Die integrale Fläche beträgt:

$$Fläche = I_0 \cdot w \cdot \sqrt{2\pi} \quad (33)$$

Eine andere häufig anzutreffende Variante lautet:

$$I(x) = \frac{I_0}{w_2 \cdot \sqrt{(\pi/2)}} e^{-\frac{2 \cdot r^2}{w_2^2}} \quad (34)$$

Hier ist an Punkt $r = w_2$ die Intensität auf e^{-2} abgefallen. Im Vergleich zur vorigen

Definition ist bei gleichem Kurvenverlauf $w_2 = 2 \cdot w$, und man kann w_2 als Durchmesser und das zuvor verwendete w als Radius der Kurve interpretieren. Bei dieser Definition ist die Fläche der Kurve auf I_0 normiert. Die Halbwertsbreite kann mit:

$$FWHM = \sqrt{\ln 4} \cdot w_2 \approx 1,18 \cdot w_2 \quad (35)$$

ungerechnet werden.

Eine dritte Definition verwendet die Breite w_e , bei der die Intensität auf $1/e$ abgesunken ist:

$$I(x) = I_0 e^{-\frac{r^2}{w_e^2}} \quad (36)$$

Die Halbwertsbreite beträgt hier:

$$FWHM = \sqrt{2 \cdot \ln 4} \cdot w_e \approx 1,67 \cdot w_e \quad (37)$$

Um all diese Funktionsdefinitionsprobleme zu umgehen, wird für die Berechnung des Auflösungsvermögens anstatt von w immer die von der definierten Funktion unabhängige Halbwertsbreite FWHM (Full Width at Half Maximum) angegeben. In der gesamten Arbeit wird zur Verbesserung der Übersichtlichkeit immer eine Gaußkurve nach Gleichung (31) verwendet.

2.5.1.2 Abbildung im konfokalen Mikroskop

Im konfokalen Mikroskop wird ein beugungsbegrenzt kleiner Punkt in der Probe mit der zuvor aufgeführten Lichtverteilung beleuchtet und das durch Reflexion oder Fluoreszenz entstehende Licht mit einer Detektionswahrscheinlichkeit gemessen, die im Idealfall die gleiche Form hat wie die Anregungsfunktion. Diese Punkt zu Punkt Abbildung gilt jedoch nur für ein punktförmiges Objekt, das bei geschlossenem Detektionsspinhole beobachtet wird. Insbesondere ist die Abbildungseigenschaft von der Geometrie der Probe (Punkt/Linie/Fläche/Raum), dem Streuprozeß (Fluoreszenz/Reflexion) und der Größe des Detektionsspinholes abhängig [Pawley1995].

2.5.1.2.1 Konfokal: Radiale Auflösung

Die radiale Auflösung verkleinert sich im konfokalen Mikroskop aufgrund der Faltung mit dem fokussierten Anregungsprofil gegenüber der gleichmäßigen Beleuchtung im konventionellen Mikroskop. Für ein punktförmiges Objekt ergibt sich eine Intensitätsverteilung, die durch die Multiplikation von Anregungsfunktion nach Gleichung (16) und Detektionsfunktion, die bei kleinem Detektionsspinhole ebenfalls mit Gleichung (16) beschrieben wird, zustande kommt:

$$I(\rho) = I_0 \left(\frac{2 \cdot J_1(\rho)}{\rho} \right)^4 \quad (38)$$

ρ ist die dimensionslose radiale Ortskoordinate in optischen Einheiten nach Gleichung (17). Die erste Nullstelle der Funktion liegt ebenso wie im konventionellen Mikroskop bei $\rho = 3,83$ radialen optischen Einheiten, jedoch fällt die Funktion

aufgrund der 4. Potenz etwas schneller ab, wodurch sich die Halbwertsbreite von 3,1 auf 2.27 radiale optische Einheiten verringert. In sehr guter Näherung ist diese Intensitätsverteilung auch mit einer Gaußfunktion beschreibbar. In realen Koordinaten ergibt sich bei kleinem Pinhole eine Halbwertsbreite von [ZeissInfoNetz]:

$$FWHM_k \approx \frac{0,36 \cdot \lambda}{NA} \quad (39)$$

Wird die Größe des Detektionspinholes berücksichtigt [Pawley1995]:S.172, zeigt sich, daß nur bei einem Radius des Pinholes von unter etwa 2 optischen Einheiten (entspricht etwa dem halben Airy Radius) dieser verbesserte Wert erhalten werden kann. Bei einem solch kleinen Pinhole ist der Signalverlust schon erheblich, was nur bei Reflexionsmessungen ohne bleichenden Fluoreszenzfarbstoff akzeptabel ist. Bei einer Öffnung des Pinholes über 4 optische Einheiten (etwa 1 Airy Radius) wird die nur um $2^{1/2} = 1,41$ verbesserte Halbwertsbreite im Vergleich zum konventionellen Mikroskop nach Gleichung (18) erreicht. Vermutlich aufgrund der Abhängigkeit von der Pinholegröße wird je nach Autor für den Faktor in Gleichung (39) ein Wert zwischen 0.34 und 0,40 angegeben.

2.5.1.2.2 Konfokal: Axiale Auflösung

Das axiale Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops ist sehr stark von der Größe des Detektionspinholes und der Geometrie der Probe abhängig. Die Größe des Detektionspinholes hat zwar auf die axiale Auflösung insgesamt einen viel größeren Einfluß als auf die radiale Intensitätsverteilung, jedoch treten die Verbreiterungen erst bei einem Radius des Pinholes von über 4 optischen radialen Einheiten (~ 1 Airy Radius) auf [Pawley1995]. Das bedeutet, daß bei einem optimal gewählte Pinholeradius von etwa 1 Airyradius nur etwa 16% Signalverlust auftreten, aber zugleich noch das hohe konfokale axiale Auflösungsvermögen erreicht wird. Wenn nicht anders angegeben, sind die berechneten Auflösungen für solch ein optimal gewähltes Pinhole angegeben. Wird das Koordinatensystem in axialen optischen Einheiten nach Gleichung (25) angegeben, so ist sogar für große Numerische Aperturen eine einfache und relativ genaue Funktion für die Intensitätsverteilung vorhanden.

Punktförmiges Objekt

Für ein punktförmiges Objekt ergibt sich eine Intensitätsverteilung, die durch die Multiplikation von der Anregungsfunktion nach Gleichung (23) und der Detektionsfunktion, die ebenfalls mit Gleichung (23) beschrieben wird, zustande kommt [Pawley1995] [Webb1996]:

$$I_{k.Punkt}(z) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^4 \quad (40)$$

Die Halbwertsbreite der Funktion liegt bei etwa 8 optischen axialen Einheiten, die nach Gleichung (25) wieder in reale Koordinaten umgerechnet werden kann [Pawley1995]:S.159:

$$FWHM_z = \frac{0,32 \cdot \lambda}{n \sin^2(\alpha/2)} = \frac{0,64 \cdot \lambda}{n - \sqrt{(n^2 - NA^2)}} \quad (41)$$

Der hintere Ausdruck enthält die Abhängigkeit von der gewohnten Numerischen Apertur des Objektivs [ZeissInfoNetz] und wird durch eine geometrische Umformung erhalten. Für kleine Numerischen Aperturen gilt die Näherung:

$$FWHM_z \approx \frac{1,27 \cdot n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (42)$$

Reflektierende Fläche

Für eine reflektierende Fläche (Spiegel) ändert sich die axiale Intensitätsverteilung im konfokalen Mikroskop zu: [Corle1996]:

$$I_{k,Spiegel}(z) = \left(\frac{\sin(u/2)}{u/2} \right)^2 \quad (43)$$

Diese Funktion ist schon nach $u = 2,78$ auf die halbe Höhe abgefallen, wodurch sich in realen Koordinaten eine Halbwertsbreite von:

$$FWHM_z = \frac{0,22 \cdot \lambda}{n \sin^2(\alpha/2)} = \frac{0,44 \cdot \lambda}{n - \sqrt{(n^2 - NA^2)}} \quad (44)$$

ergibt. Mit der Näherung für kleine Numerische Aperturen erhält man:

$$FWHM_z \approx \frac{0,88 \cdot n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (45)$$

Fluoreszierende dünne Ebene

Der dritte Fall der hier kurz behandelt werden soll, ist eine sehr dünne fluoreszierende Farbstoffschicht. Diese erhält im Gegensatz zu der reflektierenden Fläche nicht die Phaseninformation des Lichtes. Es ergibt sich dabei nach Wilson [Pawley1995]: S.179 eine Halbwertsbreite von etwa 8,4 axialen optischen Einheiten. Dies liegt nur geringfügig über dem Wert für ein punktförmiges Objekt. In realen Koordinaten ergibt sich eine axiale Halbwertsbreite von:

$$FWHM_z = \frac{0,33 \cdot \lambda}{n \sin^2(\alpha/2)} = \frac{0,66 \cdot \lambda}{n - \sqrt{(n^2 - NA^2)}} \quad (46)$$

Wie in Abbildung 24 ersichtlich ist, können all diese Funktionen gut mit Gaußkurven angenähert werden.

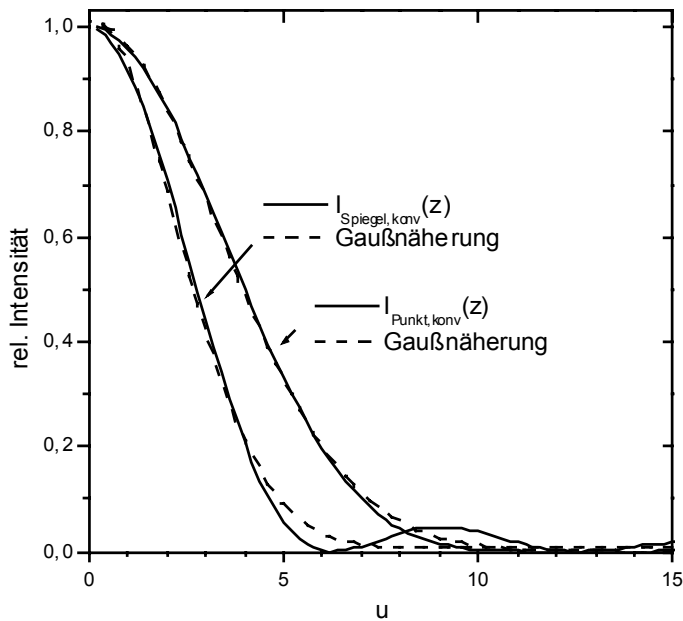


Abbildung 24: Axialer Intensitätsverlauf im konfokalen Mikroskop. Für einen Spiegel (Gleichung (43)) wird eine schmalere z-Auflösung erwartet als für ein punktförmiges Objekt (Gleichung (40)).

Die Abhängigkeiten der axialen Halbwertsbreiten des konfokalen Signals von der Numerischen Apertur des Objektivs sind in Abbildung 25 dargestellt.

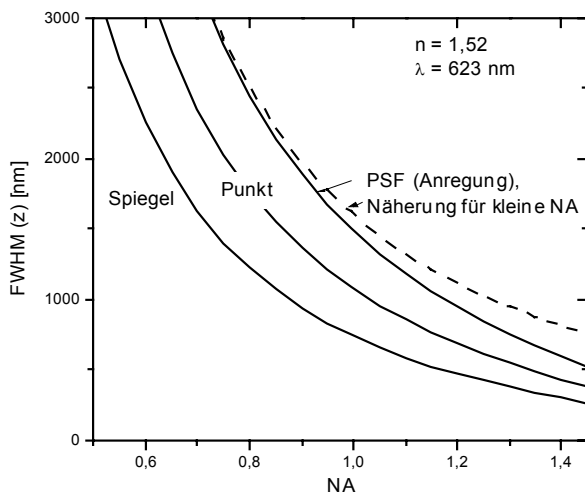


Abbildung 25: Abhängigkeit der axialen Halbwertsbreiten von der Numerischen Apertur für $n = 1,52$, $\lambda = 623 \text{ nm}$. Die Kurve für die Beobachtung eines Spiegels wurde nach Gleichung (44), das Punktobjekt nach Gleichung (41) und die Anregungsfunktion nach Gleichung (26) berechnet. Exemplarisch für alle Näherungen bei geringer NA ist für die Anregungsfunktion die Näherung nach Gleichung (27) dargestellt.

Im konfokalen Mikroskop können demnach mit sichtbarem Licht ab einer Numerischen Apertur von 1 axiale Auflösungen von unter 1 μm erreicht werden. Die Näherung für kleine NA ergibt zwar eine etwas zu große Halbwertsbreite, was aber aufgrund von Abbildungsfehlern in den Objektiven mit hoher NA durchaus praxisnahe Werte ergibt.

Optische Schichtdicke

Wird eine dreidimensionale fluoreszierende Probe vermessen, so ist die Definition der optischen Schichtdicke sinnvoll. Diese ist die Halbwertsbreite der Probe, welche zum Signal hinter dem Detektionsspinhole beiträgt. Besonders die Größe des Detektionsspinholes (P_{in} = auf die Objektebene bezogene Pinholegröße) ist für die optische Schichtdicke von entscheidender Bedeutung [ZeissInfoNetz]:

$$FWHM_{SD} = \sqrt{\left(\frac{0,64 \cdot \lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} \cdot n \cdot P_{in}}{NA^2}\right)^2} \quad (47)$$

2.6 Experimenteller Aufbau

Das Prinzip des konfokalen Mikroskopes liegt darin, daß nur der Punkt beleuchtet wird, der auch detektiert wird. Dadurch wird die Anregungsfunktion mit der Detektionsfunktion gefaltet, so daß eine schmalere Gesamtabbildungsfunktion erhalten wird. Das konfokale Meßvolumen beträgt etwa $0,3 \mu\text{m} \cdot 0,3 \mu\text{m} \cdot 0,6 \mu\text{m}$. Eine detaillierte Beschreibung des konfokalen Meßprinzips ist in Kapitel 2.5.1.2 dargestellt.

Der gesamte Strahlengang des Mikroskops ist in Abbildung 26 dargestellt.

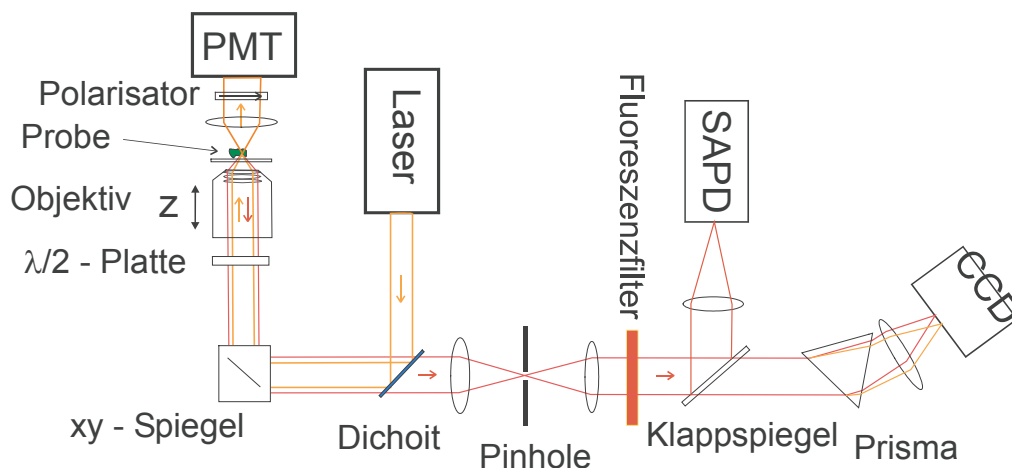


Abbildung 26: Schematischer Strahlengang im konfokalen Mikroskop.

Der Strahl eines Lasers wird über den Farberteilerspiegel (Dichroit), den xy-Spiegel und das Objektiv in die Probe fokussiert. Das entstehende Fluoreszenzlicht wird mit demselben Objektiv eingesammelt, geht denselben Weg bis zum Dichroit zurück, wird vom Dichroit jedoch durchgelassen und in die Lochblende (Pinhole) fokussiert.

Hinter dem Pinhole stehen verschiedene Detektoren bereit, die das Fluoreszenzlicht bezüglich Intensität oder Farbe analysieren. Bis zum Pinhole basiert der Aufbau zum größten Teil auf dem konfokalen Laser Scan Mikroskop LSM410 von Zeiss [Rau1999].

2.6.1 Strahlengang

Im folgenden wird der Strahlengang des Lichtes entlang dem Verlauf durch die Elemente des Mikroskops detailliert dargestellt:

2.6.1.1 Lichtquellen Laser

Als Lichtquelle kommt eigentlich nur ein Laser in Frage, obwohl das erste Konfokale Mikroskop noch mit einer Bogenlampe betrieben wurde [Minsky1961]. Ein Laser kann aufgrund seiner Kohärenz auf einen sehr kleinen Punkt fokussiert werden. Im Idealfall ist die Punktgröße nur noch von der Wellenlänge und der Geometrie der Fokussierung abhängig (siehe Gleichung (18)). Die folgende Tabelle zeigt bei welchen Wellenlängen mit welchem Laser die Messungen durchgeführt wurden.

Wellenlänge	Lasertyp	max. Leistung pro Fokusfläche	
442 nm	He-Cd Gaslaser	1 mW	Liconix He-Cd Laser 4240NB
482 nm	Kr-Ionen Laser	> 10 mW	
527 nm	YLF - Festkörper	10 mW	100 ps Pulse mit 76 MHz Rate
568 nm	Kr-Ionen Laser	> 10 mW	
594 nm	He-Ne Laser	1 mW	
633 nm	He-Ne Laser	35 μ W	Referenzlaser im Mikroskop

Verwendete Laser. Die maximale Leistung bezieht sich auf die Verwendung des 40x1,3 Ölimmersionsobjektivs.

Nur durch eine Aufweitung der Laserstrahlen wird das Mikroskopobjektiv voll ausgeleuchtet, wodurch dessen Numerische Apertur voll ausgenutzt werden kann. Die Strahldurchmesser der externen Laser werden dafür mit Hilfe von zwei Linsen, die im Abstand ihrer Brennweiten positioniert sind, auf ca. 5 mm aufgeweitet. Eine sorgfältige Justage der Aufweitung ist unbedingt notwendig, da bei konvergentem oder divergentem Strahl auch das Detektionspinhole entlang der optischen Achse justiert werden müßte. Dieses ist jedoch nicht möglich, da es von Zeiss fest für den internen He-Ne Laser justiert ist. Durch zwei justierbare Spiegel wird ein externer Laser so justiert, daß zum einen (entfernter Spiegel) möglichst viel Licht durch das Objektiv auf die Probe fällt, und zum anderen (naher Spiegel) möglichst viel Licht wieder hinter einem kleinen Detektionspinhole detektiert wird. Eine grobe Justage kann auch mit dem Rückreflex des internen He-Ne Lasers erfolgen, der am Einkoppeleingang schwach sichtbar ist.

2.6.1.2 Farbteilerspiegel - Anregung

Im Mikroskop wird das Laserlicht mittels dem Farbteilerspiegel (Dichroit) in das Objektiv gelenkt. Das Mikroskop hat einen motorisierten Spiegelwechsler für drei vorjustierte Farbteiler. Muß hier einer dieser Spiegel gewechselt werden, so muß er

mit viel Fingerspitzengefühl mit dem internen He-Ne Laser justiert werden. Eine gute Justage der Laser und des Dichroits ist bei Verwendung eines Spiegels als Probe dadurch erkennbar, daß beim Schließen des Pinholes auf etwa den Durchmesser einer Airy-Größe die Signalintensität maximal auf die Hälfte absinkt. (Die wichtigsten spektralen Eigenschaften des Dichroit werden beim Rückweg des Fluoreszenzlichtes erklärt).

2.6.1.3 Scansystem - Bilderzeugung

Anschließend passiert der Laserstrahl zwei bewegliche Spiegel, die mit Galvanometern (Typ: G120DT) vom Computer gesteuert werden. Diese Ansteuerung ist sehr schnell. Ein kleines Bild kann in weniger als 0,1 Sekunden abgerastert werden. Eine einzelne Zeile wird in etwa 1 ms abgelenkt. Die Verweilzeit auf einem Bildpunkt kann im Bereich von $\sim 1 \mu\text{s}$ bis $\sim 1 \text{ms}$ variiert werden. Eine noch schnellere Rasterung des Bildes wäre für Einzelmoleküluntersuchungen nicht sinnvoll, da aus einem einzelnen Molekül die hierfür nötigen Photonenraten von mehr als 1 Mio. Ereignissen pro Sekunde nur selten erreicht werden können. Eine langsamere Rasterung dagegen wäre durchaus sinnvoll, ist aber von der Zeiss Steuersoftware leider nicht vorgesehen. Es besteht jedoch die Möglichkeit über mehrere Bilder zu mitteln, um so eine längere effektive Verweilzeit zu erreichen. Die Bildaufnahme verläuft immer erst von links nach rechts und anschließend von oben nach unten. Dies entspricht einem Bild der Probe von oben auf das invertierte Mikroskop (nicht von der Objektivseite). Der Scanner kann auch direkt einen Punkt anfahren (spot scan), wobei zu beachten ist, daß aufgrund eines charakteristischen Versatzes ein Punkt etwa 200 nm ($40\times 1,3$ Objektiv) links oben vom gewünschten Ort angesteuert werden muß.

2.6.1.4 Telezentrisches System

Um eine effiziente Abbildung zu erreichen, muß der Drehpunkt des abgelenkten Laserstrahls im Objektiv liegen. Dies wird mit den zwei telezentrischen Linsen erreicht, die den Drehpunkt der Strahlverkippung der beweglichen Spiegel in das Objektiv abbilden.

2.6.1.5 $\lambda/2$ - Polarisationsdrehung

Direkt vor dem Objektiv wurde ein Einschub entwickelt, mit dem die Polarisations Ebene des Lasers auf der Probe gedreht werden kann. Dazu wird eine Breitband $\lambda/2$ Platte drehbar angebracht und mit einer Serie von Zahnrädern so angesteuert, daß die Platte von außen während der Messung gedreht werden kann (siehe Abbildung 27).



Abbildung 27: Drehbare $\lambda/2$ Platte (oberes Bild), die von Außen mit einem Servomotor gedreht werden kann (unteres Bild).

Der Einbau an dieser Stelle hat den Vorteil, daß das gedrehte Anregungslicht außer dem Objektiv keine weiteren optischen Elemente mehr passieren muß, welche die Polarisation zerstören könnten. Ein weiterer Vorteil ist, daß auch das Fluoreszenzlicht beim Rückweg wieder in seine normale Polarisation zurückgedreht wird. Diese Rückdrehung ist besonders wegen der starken Polarisationsabhängigkeit des Dichroit wichtig. Wird die Polarisationsdrehung nicht benötigt, kann sie herausgezogen werden, um die Effizienz des Strahlengangs nicht zu verringern. Um eine sich kontinuierlich drehende Anregungspolarisation zu erhalten, wird die $\lambda/2$ Platte mit einem Getriebemotor gedreht. Die aktuelle Polarisationsrichtung wird über den Transmissionsdetektor mit vorgeschaltetem Polarisator detektiert. Während der Drehung der Anregungspolarisation nimmt der Transmissionsdetektor ein \cos^2 förmiges Signal auf. Aus diesem kann die aktuelle Polarisationsrichtung rekonstruiert werden, wenn die Stellung des Polarisators (üblicherweise vertikal = Drehgriff zeigt nach rechts) und die Drehrichtung der Polarisation (üblicherweise gegen den Uhrzeigersinn) bekannt sind.

2.6.1.6 Objektive

Anschließend wird das Laserlicht von einem Objektiv in die Probe fokussiert. Für ein konfokales Mikroskop ist es wichtig, daß der Anregungslaser auf einen möglichst kleinen Querschnitt fokussiert, und möglichst viel Fluoreszenz der Probe wieder eingesammelt wird. Das bedeutet, daß die Numerische Apertur des Objektivs möglichst groß gewählt wird. Dagegen ist der auf den Objektiven angegebene Vergrößerungsfaktor für die konfokale Mikroskopie relativ unerheblich. Zu beachten ist, daß in der Regel alle Objektive so konstruiert sind, daß die Probe immer hinter einem $170\ \mu\text{m}$ dicken Deckglas mit einem Brechungsindex von 1,52 positioniert werden muß. Welchen starken Einfluß das gewählte Objektiv auf die Qualität der Messung hat, zeigt die Abbildung 28.

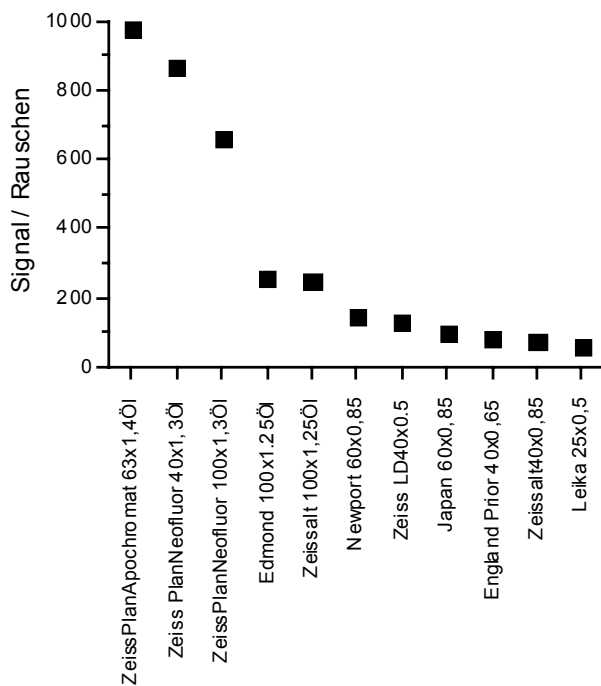


Abbildung 28: Gemessenes Signal zu Rausch Verhältnis von einzelnen TDI-Molekülen bei maximaler Anregungsleistung mit 633 nm für verschiedene Objektive. Gute Immersionsobjektive haben fast ein um eine Größenordnung bessere Meßqualität als Standardobjektive.

Die Messungen sind bei maximaler Laserleistung durchgeführt worden. Diese entspricht aufgrund der Überbeleuchtung der verschiedenen großen Objektiv Eintrittsöffnungen nicht einer gleichen Anregungsleistung. Das von der Probe reflektiert Laserlicht und das von der Probe erzeugte Fluoreszenzlicht werden von dem selben Objektiv wieder eingesammelt und laufen den vorher skizzierten Weg bis zum Farbteilerspiegel zurück.

2.6.1.7 Probe, Einbettung

Die Abbildungsfähigkeiten eines Ölimmersionsobjektives mit hoher Numerischer Apertur ($NA > 1$) sind nur dann optimal, wenn die Probe und das sie umgebende Medium den Brechungsindex von Glas $n = 1,52$ besitzen. Ist die Probe nur in Wasser mit $n = 1,33$ eingebettet, nimmt die Auflösung und das Einsammelvermögen des Objektivs mit zunehmendem Abstand vom Deckglas drastisch ab. So ist z.B. in einer Tiefe von ca. $10 \mu\text{m}$ nur noch mit der Hälfte des Signals zu rechnen [Pawley1995]. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über verschiedene Materialien zum Einbetten von Proben.

Material	Brechungsindex bei RT	Bemerkungen
Kronglas, BK7	1,52	
Immersionsöl	1,52	
PMMA	1,49	Rißbildung dicker Schichten

Glycerin	1,47	
Ethanol	1,36	verdunstet sehr schnell
Wasser	1,33	
Chloroform	1,45	verdunstet sehr schnell
Dodekan	1,42	
Ethylenglykol	1,43	1,2 Ethandiol
Silikon	1,42	setzt Essigsäure frei, Probe nicht haltbar
Epoxidharz (UHU-Endfest)	~1,4	Fluoresziert selbst erheblich, beständig gegen Lösungsmittel
Sekundenkleber	~1,4	geringe Fluoreszenz, unbeständig gegen Lösungsmittel

Übersicht über den Brechungsindex verschiedener Materialien, die zur Einbettung verwendet werden.

Sehr dünne Polymerfilme werden mittels 'spin coating' hergestellt. Dabei wird ein Tropfen ($\sim 20 \mu\text{L}$) einer etwa 1% Polymer enthaltenden Lösung des Farbstoffes ($\sim 10^{-9}$ molar) auf ein sich mit 3000 Umdrehungen pro Minute drehendes Deckglas aufgetropft. Der Tropfen verteilt sich schnell und gleichmäßig über das Deckglas, das Lösungsmittel verdunstet und es entsteht ein etwa 20 nm dicker, homogener Polymerfilm auf dem Deckglas.

2.6.1.8 Farbteilerspigel - Detektion

Der Farbteilerspigel (Dichroit) ist so konstruiert, daß er möglichst viel Laserlicht zur Probe reflektiert und zugleich möglichst viel Fluoreszenzlicht, welches eine andere Farbe besitzt, durchläßt. Gute käuflich erhältliche Filter schaffen es bei der Laserwellenlänge über 95% des Anregungslichtes zu reflektieren und etwa 12 nm langwellig 90% des Fluoreszenzlichtes durchzulassen. Der 5% ige Verlust in der Anregung ist aufgrund von ausreichender Laserleistung leicht auszugleichen. Jedoch läßt der Dichroit dann auch genau diese 5% als Reflexions- oder Streulicht in den Detektionsstrahlengang durch, weshalb anschließend weitere Filter nötig sind, um restliches Anregungslicht wegzufiltern. Die optimale Position dieser Filter ist direkt hinter dem Dichroit, doch ist diese Stelle bei dem Zeiss LMS410 schwer zugänglich, so daß sie hinter dem Pinhole plaziert wurden.

2.6.1.9 Pinhole

Eine Linse fokussiert das Detektionslicht in eine quadratische Lochblende (Pinhole), dessen Größe sich variabel bis zum völligen Verschuß verstellen läßt. So kann für alle Meßbedingungen die optimale Pinholegröße eingestellt werden. Bei der digital angezeigten Größe entspricht der maximale Wert von 255 einer realen Größe von $446 \mu\text{m}$. Abbildung 29 zeigt, wie sich das Signal und der Untergrund bei variabler Pinholegröße verändern.

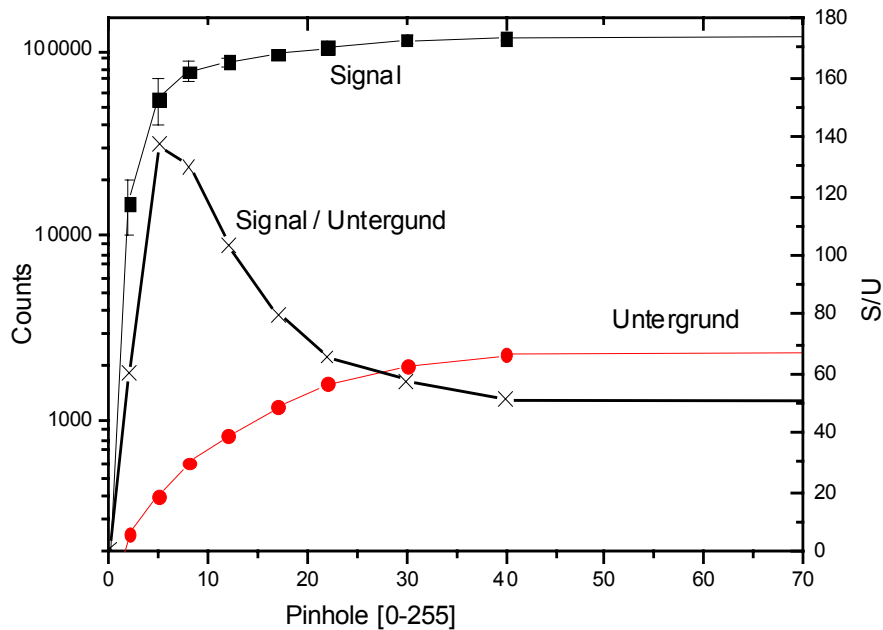


Abbildung 29: Einfluß der Pinholegröße auf das Signal eines einzelnen TDI Moleküls und den Untergrund nach dem Bleichen des Moleküls. Das Signal / Untergrund Verhältnis ist bei einer Pinholegröße von ~ 6 optimal. Bei dem verwendeten 40x1.3 Öl-Objektiv entspricht dies etwa 0,5 Airy Durchmesser.

Da der Untergrund bei sich schließendem Pinhole zuerst abnimmt, steigt das Signal zu Rausch Verhältnis zunächst an. Erst wenn bei sehr kleinem Pinhole der Signalverlust sehr stark wird, sinkt das Signal zu Rausch Verhältnis wieder. Die Position des Pinholes wird nur auf den internen He-Ne Laser und den Referenz-Dichroit (80/20 -Strahlteiler) justiert. Dadurch kann der Anregungslaser und der Dichroit nach einmaliger Justage schnell gewechselt werden.

2.6.1.10 Fluoreszenzfilter

Hinter dem Pinhole werden Filter plaziert, die restliches Anregungslicht wegfiltern. Gute, käuflich erhältliche Interferenzfilter blocken bei der Anregungswellenlänge etwa 1 Mio. fach (optische Dichte, OD = 6), und haben bereits ~13 nm langwellig eine Transmission von über 90%. Einen Vergleich der Transmissionskurven verschiedener Fluoreszenzfilter zeigt Abbildung 30.

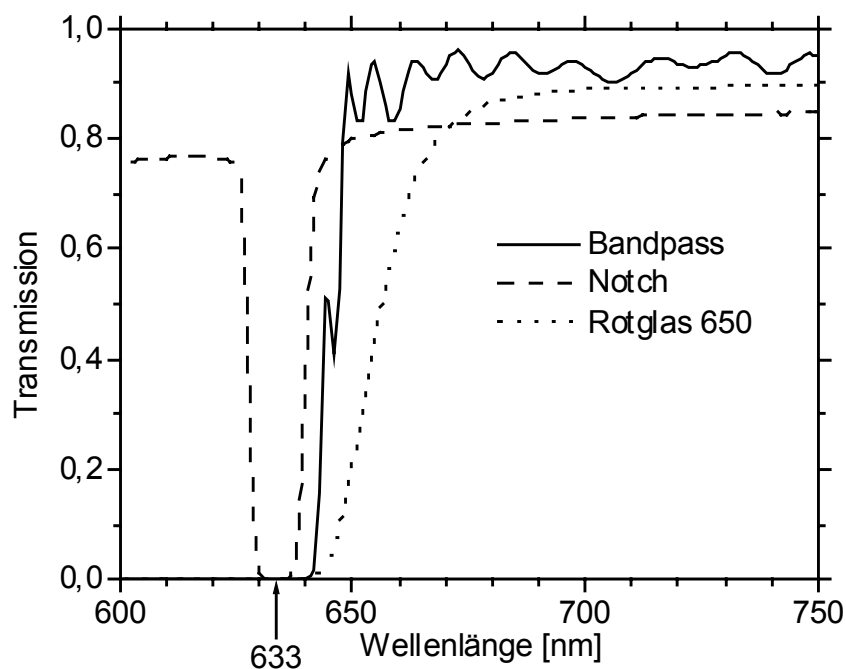


Abbildung 30: Transmissionskurven verschiedener Fluoreszenzfilter zur Unterdrückung der Anregungswellenlänge bei 633 nm: (Linie) Bandpaßfilter HQ720/150, (Gestrichelt) Super-Notch(+) Filter, (Gepunktet) Rotglas RG 650.

Oft ist die Blockung noch nicht gut genug, so daß ein zweiter Filter nötig wird. Dazu reicht in der Regel sogar ein Farbglas (Fa. Schott) aus. Zu beachten ist, daß das Farbglas nach dem Interferenzfilter positioniert wird, da die Farbgläser selbst etwas fluoreszieren. Zwei verschiedene Modelle von Interferenzfiltern sind erhältlich: Zum einem die sog. Notch Filter (Kaiser, bezogen über LOT), die genau bei der Laserwellenlänge eine hohe Blockung besitzen und nahezu alle anderen Wellenlängen ungestört durchlassen, und zum anderen Bandpaßfilter (AHF-Analysentechnik), die nur einen bestimmten Bereich, und diesen mit starken Modulationen durchlassen. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß mit den Bandpaßfiltern trotz der scheinbaren Nachteile bessere Resultate erhalten werden. Dies liegt daran, daß die unerwünschte Untergrundstrahlung nicht nur aus der Laserfrequenz und der zugehörigen nicht herausfilterbaren Ramanstreuung besteht, sondern zum Großteil auch aus Licht im nahen Infrarotbereich, bei dem die Halbleiterdetektoren noch sehr empfindlich sind. Geeignet gewählte Bandpaßfilter lassen nur dort Licht durch, wo auch der Farbstoff fluoresziert.

2.6.2 Detektionsmethoden

2.6.2.1 Intensität, Bilder

Das nun gefilterte Fluoreszenzlicht wird von verschiedenartigen Photodetektoren registriert. Im Zeiss LSM 410 ist bereits ein guter Photomultiplier (R3896) [Hamamatsu1994] mit einer Quantenausbeute von über 10% bei 650nm installiert. Dieser ist jedoch so nahe an den internen Farbglasfiltern eingebaut, daß aufgrund deren Eigenfluoreszenz keine Messungen mit einzelnen Molekülen möglich waren. Als externer Detektor wird eine spezielle Photodiode (Single Photon Counting

Avalanche Photodiode, SAPD) SPCM-AQ 141 der Firma EG&G verwendet, die im sog. Einzelphotonzählmodus betrieben wird [Brown1987]. Die Diode verwandelt bis zu 70% aller auftreffenden Photonen in ein elektrisches Signal (siehe Abbildung 31).

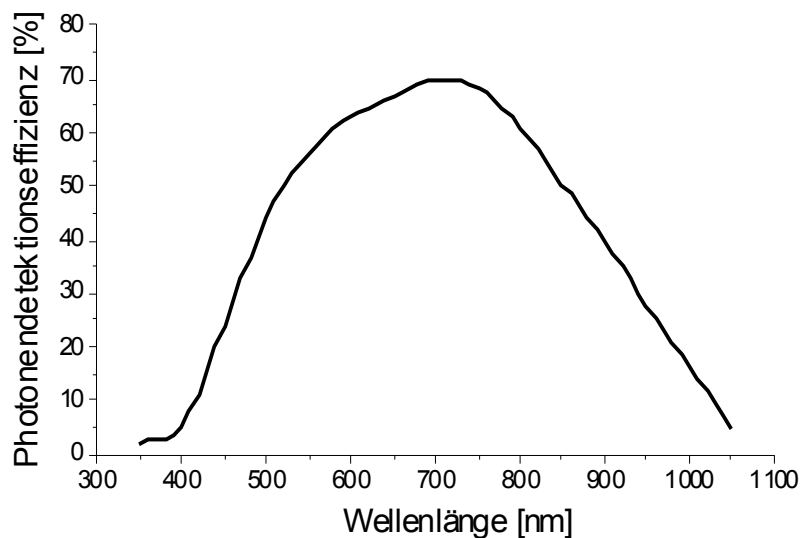


Abbildung 31: Wellenlängenabhängigkeit der Quanteneffizienz einer Single Photon Counting Avalanche Photodiode. (Neueste Datenblätter geben sogar eine maximale Quanteneffizienz von 90% an)

Problematisch ist der Anschluß der SAPD an den analogen Eingang des Mikroskops. Ideal wäre ein Zähler, der während der Laser auf einem Bildpunkt steht, die Anzahl der registrierten Photonen zählt und dann als Spannung an das Mikroskop übergibt. Diese Lösung konnte aus mehreren Gründen nicht realisiert werden. Zum einen konnten von der Firma Zeiss keine Informationen über die elektrischen Signale bekommen werden, wo und wann der Laser gerade auf der Probe positioniert wird. Zum anderen wird bei schneller Bildaufnahme so schnell über die Probe gerastert, daß ein Bildpunkt in nur 1 μ s aufgenommen wird, wodurch überwiegend nur Zählereignisse von 0 und 1 auftreten würden. Die Lösung des Problems ist ein variabler Pulsverlängerer der etwa 9 ns langen elektrischen Ausgangsimpulse der SAPD. Wird das Ausgangssignal der Diode in etwa so lange verlängert wie die Verweilzeit des Anregungslasers auf einem Bildpunkt, so mißt der Analogeingang des Mikroskops eine hohe Spannung (entspricht einem hellen Bildpunkt), wenn mindestens ein Photon detektiert wurde. Bei langsameren Rastergeschwindigkeiten und höheren Photonenraten kann diese Lösung interessanterweise auch Intensitäten unterscheiden, da vermutlich eine analoge Integrationsschaltung vor dem Analog-Digitalwandler des Mikroskops eingebaut ist. Die Intensitätsskalierung der Bilder in Einheiten einer Zählrate kann aber nur mehr abgeschätzt werden. Dazu muß jedes mal ein Vergleich mit einem externen Frequenzzähler durchgeführt werden. Realisiert wird der Pulsverlängerer mit einem sog. TTL-Chip, der zwei sogenannte Monoflops enthält, die aus einem kurzen Eingangspuls einen Puls erzeugen, dessen Länge von der Größe eines Widerstand und eines Kondensators abhängt. Abbildung 32 zeigt den elektrischen Schaltplan.

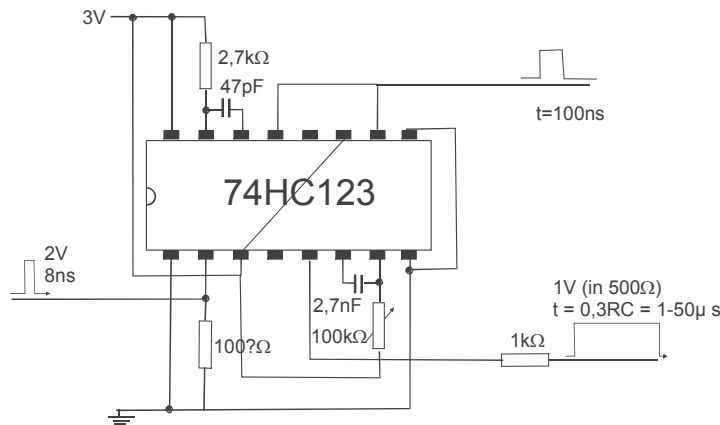


Abbildung 32: Elektronischer Schaltplan des Pulsverlängerers, um eine SAPD an den Analogeingang des Mikroskops anzuschließen.

Um die nur 2 V hohen Pulse der verwendeten SAPD zu erkennen, muß der Baustein mit 3 V betrieben werden. Der zweite Monoflop in dem Chip wird verwendet, um 100 ns lange Pulse zu erzeugen, die ein Frequenzzähler registriert, damit ständig die Belastung der Photodiode überwacht werden kann. Auf dem Gehäuse ist eine Eichkurve angebracht, auf der die Sättigung des Zählers (Sättigungsrate = 2,8 MHz, Abweichungen vom linearen Verhalten ab etwa 500 kHz) berücksichtigt wird.

2.6.2.2 Fluoreszenzautokorrelationen

Zur Aufnahme von Fluoreszenzautokorrelationsspektren (FCS) wird das elektrische Signal der SAPD an einem Hardware-Korrelator (ALV-GmbH, Langen; Modell ALV-5000/E Fast Tau Extension) angeschlossen. Die Meßwerte werden von dem Programm der ALV-Karte im ASCII-Format gespeichert. Diese Datei ist zwar lesbar, jedoch sind die Meßwerte blockweise und ohne x-Achse gespeichert. Das Konvertierungsprogramm "ALVConvert" (siehe Anhang 8.5.3.2) berechnet die entsprechende Zeit-Achse und speichert diese mit den Autokorrelationsmeßdaten in einer neuen Datei ab. Zusätzlich wird auch der zeitliche Intensitätsverlauf gespeichert. Diese Datei kann dann vom Programm Origin zur weiteren Auswertung eingelesen werden.

Zwei verschiedene Untersuchungen werden mittels FCS durchgeführt. Zum einem werden diffundierende Moleküle untersucht, zum anderen an ortsfesten Molekülen die Tripletraten bestimmt.

2.6.2.2.1 Diffusionsauswertung

Die Auswertung von FCS - Diffusionskurven beruht auf der Theorie von Elson und Madge [Elson1974], mit der die durch Diffusion hervorgerufenen Intensitätsfluktuation in einem zweidimensionalen gaußförmigen Detektionsprofil mit dem Gaußradius w berechnet werden:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{A}{1 + \frac{\tau \cdot 4D}{w^2}} \quad (48)$$

Der Gaußradius w des hier verwendeten konfokalen Mikroskopes beträgt etwa 150 nm. Die Formel berücksichtigt nur zwei Dimensionen. Dabei ist es egal, ob der Laser nur so schwach fokussiert wird, daß die z-Dimension unberücksichtigt bleiben kann, oder ob tatsächlich eine auf zwei Dimensionen beschränkte Diffusion (z.B. in Membranen) vorhanden ist. Wird das konfokale Detektionsvolumen mit einer dreidimensionalen Gaußfunktion angenähert, so kann die FCS -Diffusionskurve auch für das dreidimensionale Problem gelöst werden [Rigler1993]:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{A}{\left(1 + \frac{\tau \cdot 4D}{w^2}\right) \cdot \left(1 + \frac{\tau \cdot 4D}{w_z^2}\right)^{1/2}} \quad (49)$$

Da jedoch die Auflösung in z-Richtung ($w_z \sim 610$ nm) etwa 4 mal schlechter als in xy-Richtung ist, wird der Nenner des Bruches durch den zusätzliche Faktor nicht sehr viel größer, wodurch sich das dreidimensionale Modell vom zweidimensionalen nur minimal unterscheidet. Besonders bei langen Zeiten verlaufen die 3D Kurven etwas steiler. Abbildung 33 zeigt die Anpassungen einer Messung mit den verschiedenen Modellen.

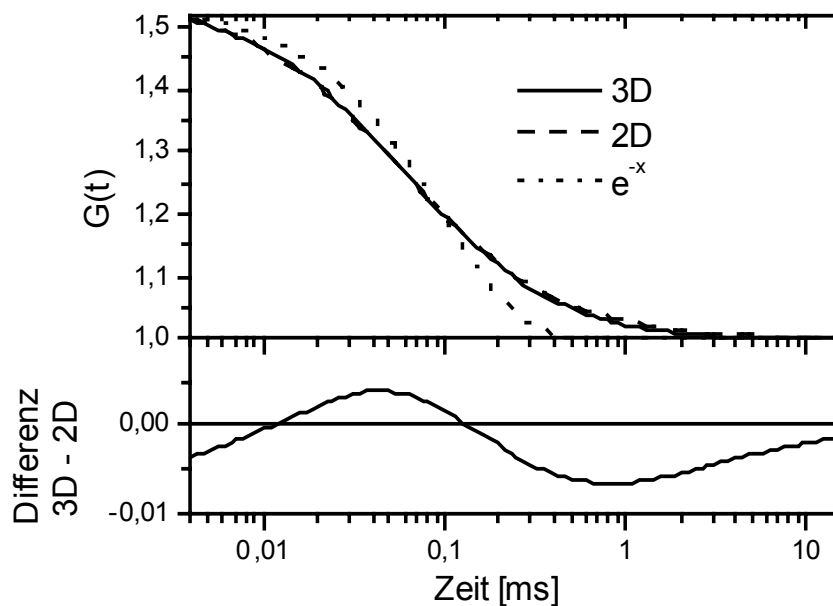


Abbildung 33: Vergleich der verschiedenen Modelle zur Ermittlung der Diffusionskonstanten aus einer FCS Kurve. Die eigentlichen Meßdaten werden von dem 3D Modell optimal beschrieben und wurden aufgrund der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Der geringe Unterschied zwischen 3D und 2D Modell ist in der unteren Kurve dargestellt. Eine Exponentialkurve zeigt einen deutlich anderen Verlauf.

Die auch in dieser Graphik dargestellte Exponentialfunktion, die eine interne Dynamik des Farbstoffmoleküls anzeigen würde (siehe nachfolgende Triplettauswertung), ist gut von den Diffusionskurven unterscheidbar. Die Abmessungen des konfokalen Meßvolumens werden entweder aus einem gutem Einzelmolekülbild eines immobilen

Moleküls oder aus einer Vergleichsmessung mit bekannter Diffusionskonstante ermittelt. Typische Größen der Gaußradien sind $w = 150 \text{ nm}$, $w_z = 610 \text{ nm}$ (40x1.3 Ölimmersionsobjektiv, Pinholegröße = 1 Airy Einheit).

Der Verlauf der Autokorrelationsfunktion für eindimensionale Diffusion senkrecht zur optischen Achse ist bisher nicht bekannt und wird analog der Theorie von Elson und Madge hergeleitet [Seebacher2002]. Dabei wird der Verdacht bestätigt, daß für jede Dimension ein wurzelförmiger Faktor im Nenner der Gleichungen vorkommt. Dadurch wird der Kurvenverlauf bei zunehmender Dimensionalität immer steiler. Für die eindimensionale Diffusion ergibt sich ein Verlauf von:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{A}{\left(1 + \frac{\tau \cdot 4D}{w^2}\right)^{1/2}} \quad (50)$$

Ein Beispiel für die eindimensionale Diffusion ist in Kapitel 4.4.8 aufgeführt.

2.6.2.2.2 Triplettatenauswertung

Die Theorie [Mais2000] [Kummer1996] [Schwille1996], die hier nicht wiederholt werden soll, beschreibt den Verlauf einer normierten Autokorrelationsfunktion für ein drei-Niveau-System, das einen Farbstoff mit einem Triplett-Zustand darstellt, mit einer Exponentialfunktion:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + C \cdot e^{-\lambda \cdot \tau} \quad (51)$$

Darin ist C der Kontrast und λ der Zerfallsparameter [1/s] der Autokorrelationsfunktion. Bei hohem Streulichtuntergrund muß der gemessene Kontrast mit der Signalrate S und der Untergrundrate U korrigiert werden [Kummer1996]:

$$C_{\text{kor}} = C \cdot \left(\frac{S+U}{S}\right)^2 \quad (52)$$

Die Raten in einem drei-Niveau-System können in den Kontrast C und den Zerfallsparameter λ zurückgeführt werden [Mais2000]. Näheres zu den Raten im drei-Niveau-System im Kapitel 3.1.

$$C = \frac{k_{23}^{\text{eff}}}{k_{31}} \quad (53)$$

$$\lambda = k_{23}^{\text{eff}} + k_{31} \quad (54)$$

Darin ist k_{23}^{eff} das Produkt aus k_{23} und der Wahrscheinlichkeit, daß das Molekül von S_0 nach S_1 angeregt wurde:

$$k_{23}^{\text{eff}} = k_{23} \cdot \frac{w}{n \cdot w + k_{21}} \quad (55)$$

Mit $n = 2$ wenn stimulierte Emission auftritt (Tieftemperatur), sonst $n = 1$. Die Anregungsrate w ist die mit der Anregungsleistung ansteigende Photonenzahl pro Sekunde, die das Molekül in seinem Absorptionsquerschnitt treffen. Um die Anregungsrate w zu bestimmen, sind leistungsabhängige Messungen notwendig, oder wenn dies z.B. aufgrund von zu schnellem Photobleichen nicht möglich ist, kann sie auch auf verschiedene Arten abgeschätzt werden. Die Rate k_{21} enthält die natürliche Fluoreszenzlebensdauer und auch die strahlungslose Deaktivierung durch interne Konversion (siehe Kapitel 3.1). Die Rate k_{21} ist daher relativ einfach durch Fluoreszenzlebensdauermessungen, wie sie in Kapitel 2.6.2.4 beschrieben werden, zugänglich.

Aus dem Kontrast C und dem Zerfallsparameter λ kann direkt durch Auflösen der Gleichungen (53) und (54) die Tripletzerfallsrate k_{31} und die effektive, aber leistungsabhängige, Intersystemcrossingrate $k_{23_{eff}}$ berechnet werden:

$$k_{31} = \frac{\lambda}{1+C} \quad (56)$$

$$k_{23_{eff}} = \frac{\lambda \cdot C}{1+C} \quad (57)$$

Zur Berechnung der realen Intersystemcrossingrate k_{23} ist jedoch nach Gleichung (55) die Bestimmung der Anregungsrate w nötig:

Diese kann auf mehrere verschiedene Methoden ermittelt werden.

2.6.2.2.1 Abschätzen der Anregungsrate aus leistungsabhängigen Messungen

Die Anregungsrate w steigt linear mit der Anregungsleistung an. Werden Messungen mit verschiedenen Anregungsleistungen durchgeführt, kann die Rate $k_{23_{eff}}$, die aufgrund der Singulettlebensdauer k_{21} mit steigender Anregungsleistung nach Gleichung (55) sättigt, modifiziert werden.

$$k_{23_{eff}}(I) = k_{23} \cdot \frac{\frac{w}{I} \cdot I}{k_{21} + \frac{w}{I} \cdot I} \quad (58)$$

Darin ist w/I der Parameter der leistungsabhängigen Anregungsrate, I die variable Anregungsleistung und k_{21} die Fluoreszenzlebensdauer, die für den Farbstoff unabhängig mit einer Kurzzeitmessungen bestimmt wird. Für eine gute Anpassung sind sehr exakte Messungen von $k_{23_{eff}}$ nötig. Optimal sind Werte mit sehr hohen Anregungsleistungen I , bei denen eine deutliche Sättigung auftritt. Die Genauigkeit der Methode hängt von den vorhandenen Meßwerten $k_{23_{eff}}$ ab; in der Praxis ist eine Bestimmung von w auf $\sim 20\%$ möglich.

2.6.2.2.2 Abschätzen der Anregungsrate aus molekularen Daten

Die Absorptionsrate kann auch aus dem Extinktionskoeffizienten und der Fokusgröße abgeschätzt werden. Der dekadische Absorptionskoeffizient ε , der aus

Absorptionsmessungen als makroskopische Meßgröße zugänglich ist, ist nach Gleichung (59) in dem molekular definierten Absorptionsquerschnitt σ umrechenbar.

$$\sigma [m^2] = \epsilon \left[\frac{\text{liter}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right] \cdot \frac{\ln(10) \cdot 0.1}{6,022 \cdot 10^{23}} \quad (59)$$

Der Absorptionsquerschnitt σ stellt diejenige Fläche dar, innerhalb der ein Farbstoffmolekül ein "vorbeifliegendes" Photon einfängt. Bei Raumtemperatur entspricht diese Größe auch der Ausdehnung des π -Systems von etwa 0.04 nm². Molekular ist der Absorptionsquerschnitt mit der Oszillatorstärke des Übergangs und der spektralen Breite des Absorptionsspektrums verknüpft (siehe Kapitel 3.1.2).

Berechnet man nun aus der Anregungsleistung I nach $R = I / h\nu$ die Photonenzahl R , und korrigiert diese mit dem Verhältnis aus Absorptionsquerschnitt und Fokusfläche (Formel (21)) erhält man genau die gesuchte Anzahl der Photonen, die das Farbstoffmolekül "treffen":

$$w = \frac{I}{h\nu} \cdot \text{Orientierung} \cdot \frac{\sigma}{(w \cdot 1,42)^2} \quad (60)$$

Der Orientierungsfaktor stammt von der Polarisation des Lichtes und kann Werte zwischen 0 und 3 annehmen. Er ist nur dann gleich eins, wenn das Farbstoffmolekül isotrop im Raum orientiert ist, d.h. frei rotieren kann. Im Festkörper ist die Orientierung im Raum festgelegt, so daß im ungünstigsten Fall überhaupt gar keine Absorption stattfindet. Dafür kann im günstigsten Fall, bei paralleler Polarisation des Anregungslichts zum Übergangsdipolmoment des Farbstoffes, eine dreifach erhöhte Absorptionswahrscheinlichkeit auftreten.

In der Praxis kann, bei unbeweglichen Molekülen, für den Orientierungsfaktor ein Wert von 2 mit einem Fehler von ± 1 angenommen werden, da die sehr ungünstig orientierten und daher lichtschwachen Moleküle vom Experimentator gar nicht für Messungen ausgewählt werden. Die so ermittelte Rate hat daher einen Fehler von mindestens 50%.

Zusammenfassend kann aus den Gleichungen (59) (60) (22) die leistungsabhängige Anregungsrate in einer Gleichung berechnet werden (Orientierung = 2):

$$\frac{w}{I} \approx \frac{2\sigma NA^2}{hc \cdot 0,307^2 \cdot \pi \lambda} = 3,4 \cdot 10^{25} [W^{-1} \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}] \frac{\sigma NA^2}{\lambda} \quad (61)$$

Für einen typischen Farbstoff mit $\epsilon = 100000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\sigma = 0,38 \cdot 10^{-19} \text{ m}^2$), 633 nm Licht und einer Numerischen Apertur von 1,3 ergibt sich eine Anregungsrate von 3,5 Mio. pro μW Anregungsleistung.

2.6.2.2.3 Abschätzen der Anregungsrate aus der Fluoreszenzrate

Da die genaue Orientierung des Farbstoffmoleküls im Festkörper oft unbekannt ist, kann auch aus der detektierten Photonenzahl eine Anregungsrate abgeschätzt werden. Mit der hier beschriebenen Methode ist dies jedoch nur möglich, wenn noch

keine Sättigung auftritt. Diese Bedingung ist bei den hier durchgeführten Messungen für den Farbstoff TDI näherungsweise erfüllt, da die gemessene Sättigungsleistung mit $\sim 60 \text{ kW/cm}^2$ sehr hoch ist. Die Anregungsrate unterscheidet sich dann von der detektierten Zählrate S nur durch die Quanteneffizienz Φ und der Detektionseffizienz η der Meßapertur.

$$w \approx \frac{S}{\Phi \cdot \eta} \quad (62)$$

Bei einer Quantenausbeute von 100% und einer geschätzten Detektionseffizienz von $\eta = 3,5\%$ ist die Anregungsrate etwa 30 mal größer als die gemessene Fluoreszenzrate.

Der Fehler der so ermittelten Rate liegt bei etwa 30%.

2.6.2.3 Fluoreszenzspektren

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wird eine Kombination aus Dispersionsprisma und CCD-Kamera eingesetzt. Das Prisma wurde gewählt, da es gegenüber einem Beugungsgitter entscheidende Vorteile besitzt. Ein Prisma hat nahezu keine Verluste der dispergierten Photonen, während ein Gitter immer gewisse Anteile in andere Ordnungen beugt. Dies ist zugleich ein weiterer Nachteil des Gitters, da die Interpretation des erhaltenen Spektrums aufgrund verschiedener Ordnungen kompliziert werden kann oder die Verwendung von zusätzlichen Farbfiltern nötig macht. Der Vorteil der hohen Dispersion eines Gitters ist bei Fluoreszenzspektren von organischen Molekülen bei Raumtemperatur nicht relevant, da Raumtemperaturspektren mit Halbwertsbreiten von etwa 30 nm sehr breit sind, und daher eine Auflösung von wenigen nm ausreicht, um das Spektrum vollständig aufzuzeichnen. Der Nachteil, der vermutlich viele von der Verwendung eines Prismas abhält, ist seine nichtlineare Dispersion, d.h. blaues Licht wird viel stärker abgelenkt als rotes. Dies führt auf den äquidistanten Detektionspunkten einer CCD-Kamera zu einer nichtlinearen Skalierung der Wellenlängenachse. Zugleich sind dadurch auch die gemessenen Intensitäten im roten Spektralbereich höher als im blauen. All diese Probleme können jedoch durch eine exakte Kalibrierung gelöst werden. Dazu wird mit Licht bekannter Wellenlänge der Auftreffpunkt auf der CCD - Kamera (in Pixeln) bestimmt. Durch mehrere dieser Messungen kann eine theoretische Kurve so angepaßt werden, daß jedem Pixel eine bestimmte Wellenlänge zugeordnet werden kann. Abbildung 34 zeigt den Strahlengang im Prismenspektrographen.

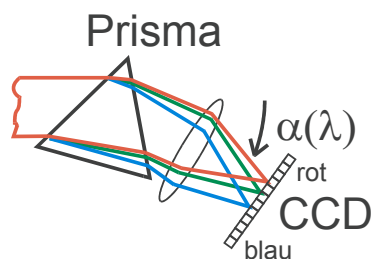


Abbildung 34: Skizze des Strahlengangs im Prismenspektrographen. Ein paralleler Lichtstrahl wird von dem Prisma dispergiert und mit einer Linse auf den CCD-Flächendetektor abgebildet.

Es gibt einen, in einem begrenzten Wellenlängenbereich gültigen, Zusammenhang mit den beiden Parametern P4 und P5 zwischen dem Brechungsindex n eines Mediums und der Wellenlänge λ [Hecht1987]:

$$n^2 = 1 + \frac{1}{\left(\frac{\lambda}{P4}\right)^2 + P5} \quad (63)$$

Außerdem kann mit drei weiteren Parametern, nach dem Brechungsgesetz, über den Brechungsindex n ein Ablenkwinkel bestimmt werden, der wiederum die Position des Lichtpunktes auf der CCD-Kamera in Pixel bestimmt:

$$n = P1 \cdot \sin\left(P2 - \frac{Pixel}{P3}\right) \quad (64)$$

Die Abbildung 35 zeigt auf der linken Seite, daß mit den Gleichungen (63) (64) eine gute Anpassung an die experimentellen Werte möglich ist.

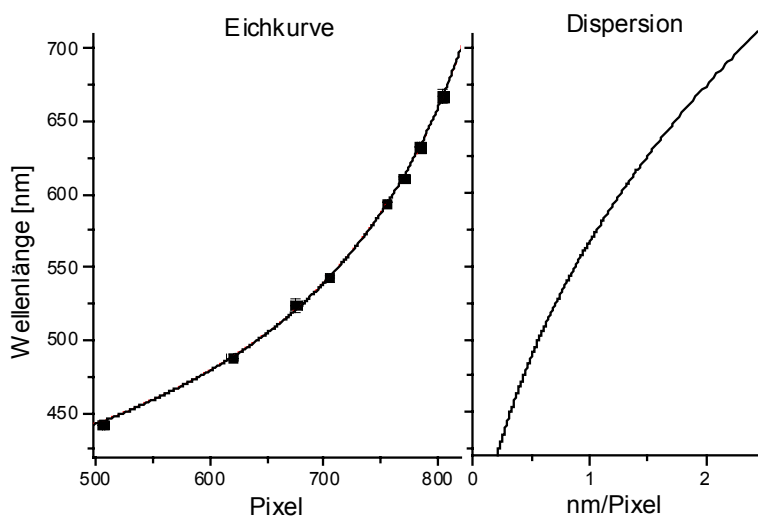


Abbildung 35: Links: Anpassung der Dispersionskurve des Prismenspektrographen an 8 Eichpunkte (Parameter: P1 = 2,08945, P2 = 2850,07, P3 = 2054,16, P4 = 186,789, P5 = 0,55998), Rechts: Dispersionsstärke des Spektrographen (Ableitung nach der Wellenlänge).

Die Ableitung der Kurve nach der Pixelposition auf der rechten Seite in Abbildung 35 zeigt die Dispersionsstärke des Spektrographen, d.h. wie viele nm des Spektrums auf ein Pixel der CCD fallen. Die gemessenen Intensitätswerte müssen aufgrund dieser spektralen Dichte korrigiert werden. In diesem Zusammenhang bietet es sich an, das Spektrum gleich auch noch um die spektrale Charakteristik aller weiteren Elemente zu korrigieren. Die Umrechnung des Signals S eines Pixels der CCD in die übliche Energieskala I mit einer nm-Punktdichte berücksichtigt die Quanteneffizienz des CCD-Detektors Φ_{CCD} , die Transmission des Prismas (70%) und die Ableitung der Dispersionseichkurve:

$$I = S \frac{hc}{\lambda} \frac{\Phi_{CCD} \cdot 0,7}{\text{Kanalbreite}} \quad (65)$$

Der Verlauf dieser Eichkurve berücksichtigt noch nicht die Charakteristik der Filter. Abbildung 36 zeigt die mit Gleichung (65) bestimmte Empfindlichkeit des Prismenspektrographen.

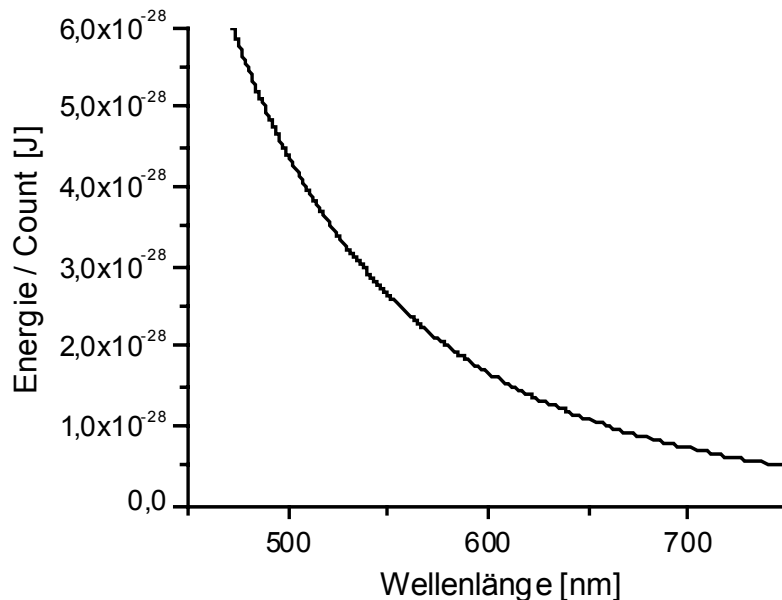


Abbildung 36: Berechnete Intensitätseichkurve des Prismenspektrographen (Lichtmenge [J] pro Intensitätswert der CCD).

Eine ähnlichen Verlauf hat eine Eichkurve, die mit einer Halogenlampe mit bekannter spektraler Charakteristik erstellt wird.

Um den Untergrund von der CCD-Kamera und von restlichem Streulicht vom gemessenen Signal abzuziehen, ist es notwendig, am Ende des Versuches (nachdem z.B. das Einzelmolekül verblichen ist) einige Untergrundspektren aufzunehmen. Erst nach der Untergrundsubtraktion kann die Intensitätskorrektur sinnvoll durchgeführt werden.

Werden die Filter bei der Intensitätskorrektur berücksichtigt, wird an den Stellen, wo die Empfindlichkeit des Aufbaus sehr gering ist (d.h. an den Stellen an denen die Filter Blocken), durch die Multiplikation mit sehr großen Zahlen ein starkes Rauschen erzeugt. Diese Stellen werden daher anschließend verworfen. Auf diese Weise werden auch Spektren, die durch die Charakteristik der Filter entstehen, sofort entlarvt. Abbildung 37 zeigt die einzelnen Schritte vom gemessenen Spektrum zum korrigierten Fluoreszenzspektrum.

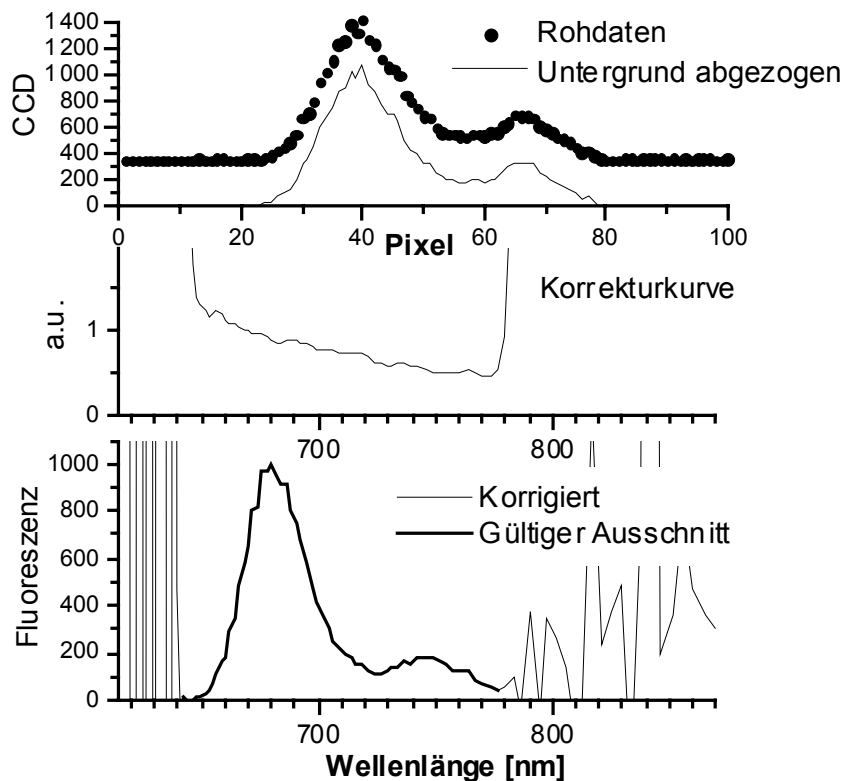


Abbildung 37: Korrektur der Fluoreszenzspektren: Von den gemessenen Rohdaten der CCD-Kamera wird der Untergrund nach dem Bleichen des Moleküls abgezogen (oben). Anschließend wird die x-Achse ausgewechselt und die Intensität mit der für die Filter passenden Korrekturkurve (mitte) korrigiert. Das Ergebnis ist ein korrigiertes Fluoreszenzspektrum (unten), das noch in den gültigen Bereich zugeschnitten wird (unten - fett).

Um auch Zeitverläufe mit mehreren tausend Fluoreszenzspektren zu korrigieren, führt ein Labview Programm diese Korrekturen automatisiert durch (siehe Anhang 8.5.2.1).

Die CCD-Kamera (charge coupled device) besitzt einen sogenannten 'Backilluminated' Detektorchip, der sich durch extrem hohe Quanteneffizienzen auszeichnet (Princeton Instruments, EEV 1300/100-EMB-Chip). Bei der Beschaffung der Kamera wurde besonders darauf geachtet, daß möglichst wenige Photonen in einem Kanal detektiert werden können. Dazu muß beim Auslesen des CCD-Chips nahezu jedes Elektron, das durch ein Photon entstanden ist, gelesen werden. Technisch realisierbar ist dieser Prozeß zur Zeit mit einer Unsicherheit von etwa 2 Elektronen. Um z.B. ein Signal zu Rausch Verhältnis von 1:1 zu Erreichen sind mindestens 4 detektierte Photonen nötig ($4 / (4^{1/2} + 2) = 1$).

Gemäß dem Datenblatt des CCD-Chips sollte eine kontinuierliche Aufnahme von Spektren mit einem Anstand von 2 ms möglich sein:

7 Zeilen in die Auslesezeile schieben	105 μ s
1100 ungenutzte Pixel in der Ausleseeinheit entladen	990 μ s
200 Punkte mit einer Meßfrequenz von 430kHz lesen	460 μ s
Gesamtzeit	1,555 ms

Erreicht wurden bisher nur 19 ms, was bisher aber für alle Experimente ausreichend war. Vermutlich ist der Meßrechner zu langsam.

Zur Bestimmung des spektralen Auflösungsvermögens des Prismenspektrometers wird der Rückreflex des He-Ne Lasers (632.8 nm) vermessen, und mit einer Gaußkurve angepaßt. Abbildung 38 zeigt, daß das Auflösungsvermögen für diese Wellenlänge bei 2,2 nm liegt.

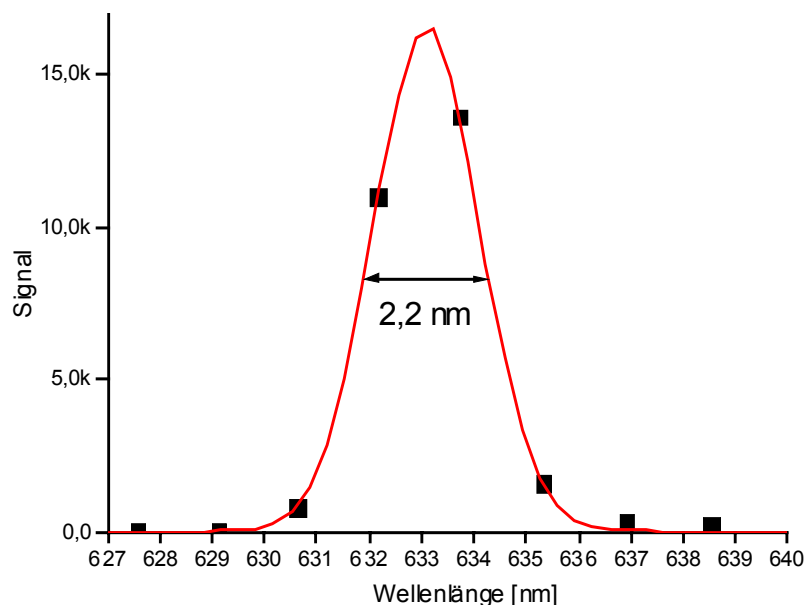


Abbildung 38: Spektrales Auflösungsvermögen von 2,2 nm des Prismenspektrographen bei $\lambda = 633$ nm.

Von einigen einzelnen Molekülen ist es möglich, viele tausend Fluoreszenzspektren zu detektieren. Zur Analyse von derartig vielen Spektren wird ein Labview Programm verwendet (siehe Anhang). Dieses kann die zuvor korrigierten Spektren mit mehreren Gaußfunktionen anpassen. Aus den Diagonalelementen der Konvergenzmatrix C_{ii} der Labview Anpassungsroutine (Nicht-lineare Levenberg-Marquardt-Anpassung) und der quadratischen Abweichungen χ^2 wird der Fehler der Wellenlängenbestimmung ermittelt:

$$\Delta x_i = \sqrt{C_{ii} * \chi^2} \quad (66)$$

Um die Zuverlässigkeit der Wellenlängenbestimmung zu überprüfen wird eine Simulation durchgeführt [Press1992]. Dazu werden viele Fluoreszenzspektren simuliert und mit Poisson-Rauschen versehen. Die Parameter für die Fluoreszenzspektren und deren Anpassung werden aus Untersuchungen des Farbstoffes TDI in Kapitel 4.8.2 gewonnen. In der Simulation wird das Maximum der Fluoreszenzspektren um wenige nm leicht moduliert. In Abbildung 39 sind für

zwei verschiedene Fluoreszenzintensitäten die ermittelten Fluoreszenzwellenlängen dargestellt.

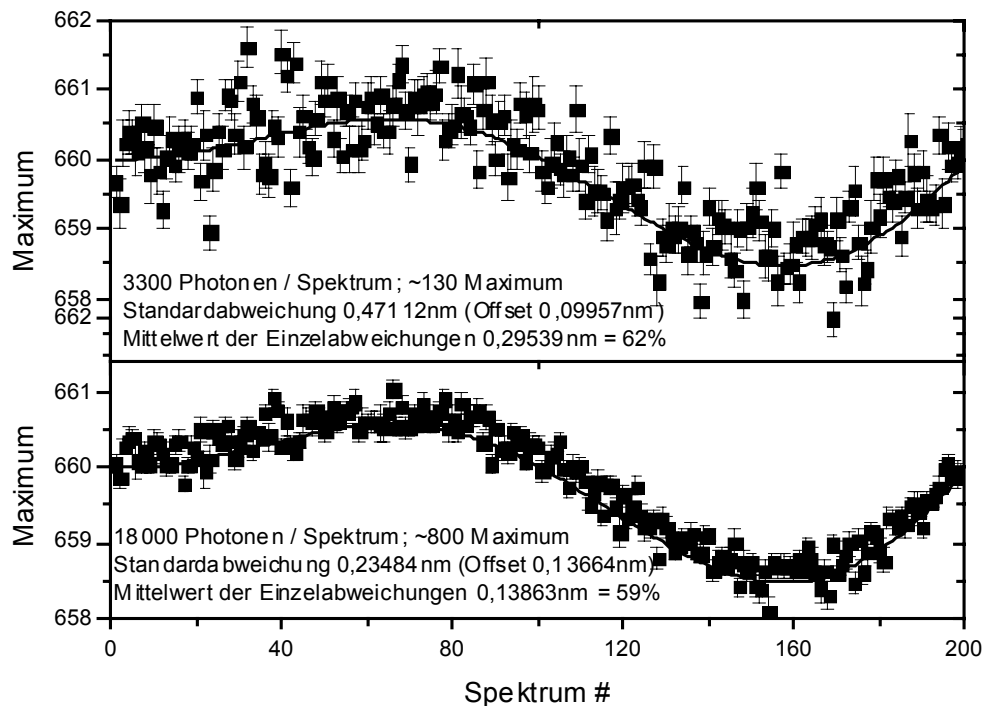


Abbildung 39: Simulation der Bestimmungsgenauigkeit der Fluoreszenzmaxima. Für niedrige (3300 Photonen pro Spektrum, oben) und hohe (18000 Photonen pro Spektrum, unten) Intensität sind Fluoreszenzspektren simuliert (durchgezogene Linie) und Analysiert (Punkte) worden. Leider ermittelt die Analyse der einzelnen Punkte einen um ~60% zu kleinen Fehler.

In beiden Fällen kann die Wellenlänge besser als 0,5 nm bestimmt werden, doch leider liefert die Anpassung der einzelnen Gaußfunktionen einen ~60% kleineren Fehler als aufgrund der real vorhandenen Standardabweichung erwartet wird. Mehrere Ursachen sind für dieses Verhalten möglich. Zum einen wird aufgrund der Anwendung der Intensitätskorrektur (wegen der Filter und des Prismas) die Poisson-Statistik geringfügig verändert, zum anderen werden vier der neun Parameter der drei Gaußfunktionen zur Beschreibung der Fluoreszenzspektren nicht angepaßt (siehe Kapitel 4.8.2). Aufgrund der hier gefundenen Abweichung werden vorsichtshalber alle mit diesem Auswerteprogramm ermittelten Fehler um den Faktor 1,7 vergrößert.

2.6.2.4 Kurzzeit

Fluoreszenzlebensdauern werden über die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (time correlated single photon counting, TCSPC) ermittelt. Das Verfahren beruht darauf, daß zwar der Verlauf eines elektrischen Signals nur mit einer Auflösung von Nanosekunden (GHz Oszillograph), der Zeitabstand zwischen zwei elektrischen Pulsen aber mit einer Auflösung von Picosekunden gemessen werden kann. Abbildung 40 zeigt das Funktionsprinzip.

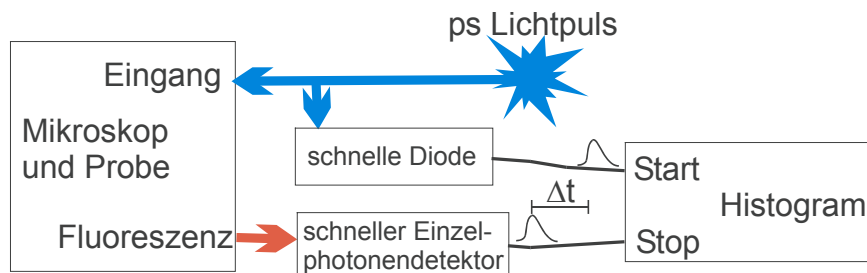


Abbildung 40: Kurzzeitmessungen mit der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung.

Von einer gepulsten Laserquelle wird mit einer schnellen Photodiode der Zeitpunkt des Startpulses ermittelt. Der Lichtpuls wird anschließend auf die Probe gelenkt und befördert dort ein Molekül in den angeregten Zustand. Der angeregte Zustand zerfällt nach der Fluoreszenzlebensdauer und sendet ein Photon aus, das in einem schnellen Detektor den elektrischen Stoppuls erzeugt. Der zeitliche Abstand zwischen Start- und Stoppuls wird gemessen, und in einem Histogramm gespeichert. Zwei typische Histogramme sind in Abbildung 41 dargestellt.

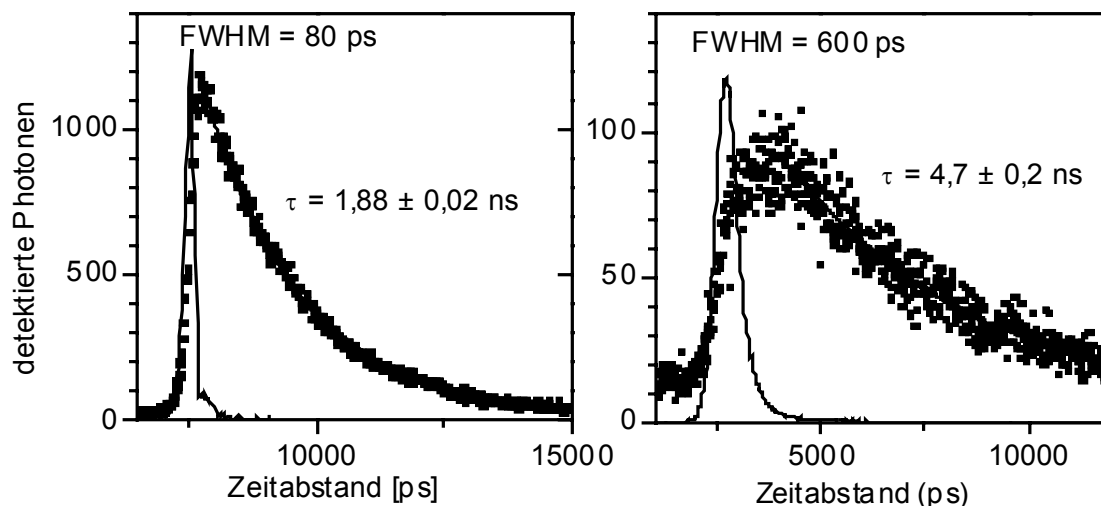


Abbildung 41: Typische Fluoreszenzzerfälle von Farbstoffen. Links: Viele Rhodamin 700 Moleküle gelöst in Ethylenglykol, detektiert mit einer Mikrokanalplatte, Rechts: Ein einzelnes Terrylen Molekül, detektiert mit einer SAPD. Die durchgezogene Kurve zeigt die jeweilige IRF (Instrument response function, Zeitauflösung des Aufbaus).

Bei der Wahl des schnellen Einzelphotonendetektors stehen zwei Varianten zur Auswahl. Die sehr schnelle Mikrokanalplatte (Hamamatsu R3809-51), die ähnlich einem Photomultiplier über den lichtelektrischen Effekt das Photon in ein Elektron verwandelt und dieses anschließend mit einer Hochspannung in kurzen Röhren vervielfacht. Die Zeitauflösung der Mikrokanalplatte beträgt wenige ps; jedoch ist die Quanteneffizienz des Detektors mit weniger als 10% sehr gering. Daher wird für die Messung an einzelnen Molekülen eine Avalanche Photodiode (SAPD) verwendet. Mit einer SAPD kann nur eine Zeitauflösung von etwa 600 ps erzielt werden, was aber für Fluoreszenzlebensdauermessungen im ns Zeitbereich ausreichend ist. In der Fluoreszenzzerfallskurve beeinflusst die schlechtere Zeitauflösung nur den Kurvenverlauf am Anfang des Signals, weshalb zur Auswertung nur Werte etwa

600 ps hinter dem Maximum herangezogen werden. Dadurch wird auch Raman-Licht, das nicht vom Fluoreszenzprozeß des Farbstoffmoleküls stammt und instantan mit dem Anregungspuls detektiert wird, in der Analyse unterdrückt.

2.6.2.5 Orientierung

Zur Bestimmung der Orientierung von Farbstoffmolekülen wird eine Zeitspur aufgenommen. Dabei wird während der kontinuierlichen Drehung einer $\lambda/2$ Platte das unpolarisiert detektierte Fluoreszenzsignal aufgezeichnet (siehe Skizze in Abbildung 42).

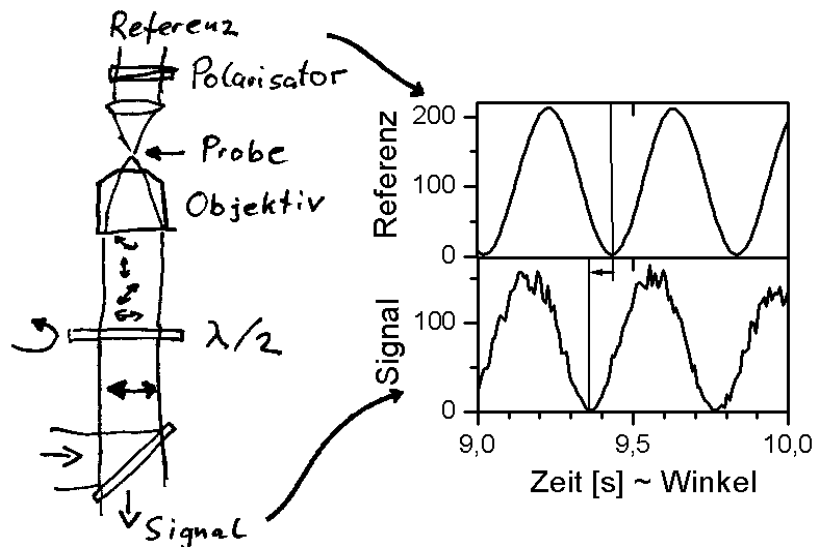


Abbildung 42: Skizze der Orientierungsmessung. Linear Polarisiertes Licht wird mit der drehenden $\lambda/2$ -Platte kontinuierlich gedreht, und über das Objektiv auf die Probe fokussiert. Die Fluoreszenz wird vom Objektiv wieder eingesammelt, von der $\lambda/2$ -Platte zurückgedreht und vom Signaldetektor registriert. Zur Bestimmung der aktuellen Polarisationsrichtung wird das nicht absorbierte Anregungslicht hinter der Probe polarisiert und von einem Referenzdetektor aufgezeichnet. Die Phasenverschiebung der beiden Signale entspricht der Orientierung des Übergangsdipolmoments.

Um die aktuelle Polarisationsrichtung des Anregungslasers zu jedem Zeitpunkt zu erhalten, wird gleichzeitig auch das durch die Probe transmittierte Licht hinter einem Polarisator als Referenzsignal aufgezeichnet. Beide Signale werden mit einer \cos^2 Kurve angepaßt:

$$I(t) = I_0 + I \cdot \cos^2(\omega \cdot t + \omega_0) \quad (67)$$

Darin ist ω die Winkelgeschwindigkeit, mit der die Polarisation gedreht wird und ω_0 die Phase des Signals. Da die Winkelgeschwindigkeit der Polarisationsdrehung für das Fluoreszenzsignal die gleiche ist wie für das Referenzsignal, wird dieser Wert nur aus dem Referenzsignal gewonnen. Aus dem Phasenunterschied zwischen Referenzsignal und Fluoreszenzsignal wird der Winkel bestimmt, den das Übergangsdipolmoment in der Probe besitzt. Steht der Polarisator im Transmissionsstrahlengang mit seinem Griff nach rechts, so wird die vertikale (y)

Polarisation detektiert. Die Drehrichtung der Polarisation ist in allen Experimenten gegen den Uhrzeigersinn (im konfokalen Bild bzw. von oben auf das invertierte Mikroskop), so daß sich für den üblicherweise gegen den Uhrzeigersinn und gegen die x-Achse definierten Winkel α (siehe Abbildung 43)

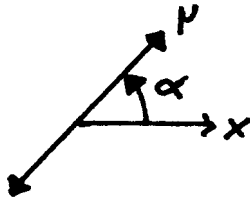


Abbildung 43: Orientierung des Übergangsdipolmoments.

folgende Umrechnung ergibt:

$$\alpha = 90^\circ - (\omega_{0, Fl.} - \omega_{0, Ref.}) \quad (68)$$

Zur Auswertung von längeren Polarisationsmessungen wird ein Labview Programm verwendet (siehe Anhang). Dazu wird die Messung in kleine Stücke mit je ~ 3 Drehungen (typisch 100 Datenpunkte) zerteilt und jeweils der Phasenunterschied bestimmt. Aus den Diagonalelementen der Konvergenzmatrix C_{ii} der Labview Anpassungsroutine (Nicht-lineare Levenberg-Marquardt-Anpassung) und der quadratischen Abweichungen χ^2 wird der Fehler der Winkelbestimmung ermittelt:

$$\Delta \omega_i = \sqrt{C_{ii} \cdot \chi^2} \quad (69)$$

Um die Zuverlässigkeit der Winkelbestimmung zu überprüfen, wird eine Simulation durchgeführt [Press1992]. Dazu wird eine Meßkurve simuliert und mit Rauschen versehen. In der Simulationskurve wackelt das Moleküls mit ansteigendem Winkel hin und her. Das Wackeln des Moleküls ist etwa 5 mal langsamer als die Polarisationsdrehung. Die Analyse dieser simulierten Meßkurve ist in Abbildung 44 dargestellt. Ein Vergleich der Standardabweichung der ermittelten Phase mit dem Fehler, den die Anpassungsroutine für jeden individuellen Abschnitt ermittelt, zeigt einen Unterschied von 173%. Da aber die Anpassungsroutine den Fehler etwas zu groß abschätzt, ist die wahre Bestimmungsgenauigkeit eher besser als angegeben. Um nicht bei anderen Versuchsbedingungen falsche Meßfehler zu erhalten, wird daher hier der Bestimmungsfehler nicht zu kleineren Werten korrigiert.

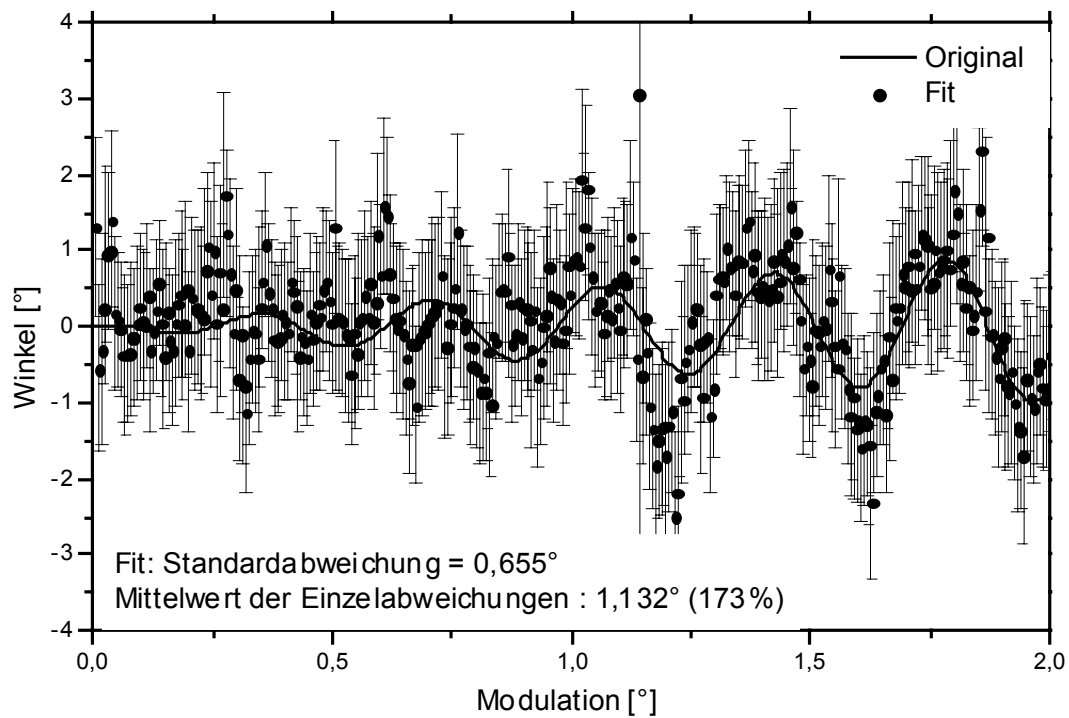


Abbildung 44: Überprüfung der Bestimmungsgenauigkeit der Phase. Simuliert wird eine sich langsam steigernde Phasenmodulation. Ab einer Modulation von etwa 1° kann eine Änderung sicher detektiert werden.

3 Probensysteme

3.1 Farbstoffe

Bei der Auswahl der organischen Farbstoffmoleküle ist die Zielsetzung der Untersuchungen zu berücksichtigen: Einzelne Farbstoffmoleküle sollen mittels der Fluoreszenzspektroskopie in Festkörpern detektiert und spektroskopiert werden. Bisher ist erst von wenigen organische Farbstoffen die Möglichkeit der Einzelmolekülspektroskopie bekannt [Ambrose1999]. Eine große Auswahl von organischen Fluoreszenzfarbstoffen für Farbstofflaser werden in dem Buch von Lambda Physics vorgestellt [Brackmann1994].

Um ein einzelnes Farbstoffmolekül mittels Fluoreszenzspektroskopie zu detektieren ist eine hohe Fluoreszenzrate nötig, die das Signal vom Rauschuntergrund abhebt [Mais2000]. Häufig populierte und langlebige Triplettzustände sind neben einer kleinen Fluoreszenzquantenausbeute die Hauptursache für geringe Fluoreszenzraten. Sehr gute Farbstoffe besitzen Fluoreszenzquantenausbeuten von nahezu 100% und verschwinden nur jeden 10000sten Photozyklus für wenige μs in den Triplettzustand. Im blauen Spektralbereich ist der Strahlungsuntergrund, der das Rauschen verursacht, besonders intensiv. Daher sollte, wenn irgendwie möglich, im roten Spektralbereich gearbeitet werden.

Jedoch ist bei vielen Experimenten nicht die hohe Fluoreszenzrate, sondern vielmehr die absolute Zahl der emittierten Photonen bis zum irreversiblen Bleichen von entscheidender Bedeutung. So sind durchaus auch Moleküle mit nur 10% Fluoreszenzquantenausbeute und ms langen Triplettzuständen detektierbar, wenn das Molekül trotzdem mehrere Millionen Photocyclen überlebt. Lediglich die Meßdauer muß dann zum Erreichen eines akzeptablen Signal zu Rausch Verhältnisses entsprechend verlängert werden.

Die bisher bekannten Untersuchungen zur Photostabilität zielen meist auf eine Untersuchung in wässrigen Medien, um die Einzelmolekülspektroskopie auf biologische Fragestellungen anzuwenden [Eggeling1998]. Daher wird hier eine Methode entwickelt, um mit dem konfokalen Mikroskop Photostabilitäten in Festkörpern zu untersuchen.

3.1.1 Das Drei-Niveau System

Das Fluoreszenzverhalten von Farbstoffen wird in der Regel gut mit einem Drei-Niveau-System beschrieben. Siehe Abbildung 45.

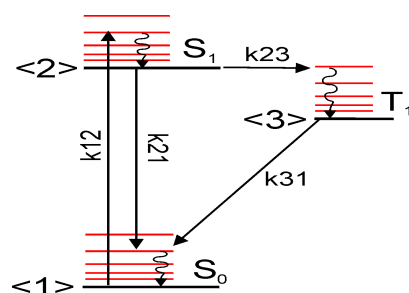


Abbildung 45: Jablonski-Schema des Dreiniveausystems eines Farbstoffes.

Durch Absorption eines Photons kann das System von dem Grundzustand S_0 , in den angeregten Zustand S_1 , gebracht werden. Von dort kann der Farbstoff verschiedene Wege einschlagen. Bei der Fluoreszenz geht das Farbstoffmolekül unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand S_0 zurück. Diese Rückkehr in den Grundzustand kann jedoch auch strahlungslos erfolgen, indem die gesamte Energiedifferenz in Schwingungsenergie des Moleküls verwandelt wird. Ein dritter Weg ist der Übergang in den Triplettzustand T_1 , aus dem die Phosphoreszenz in den Grundzustand zurückführt. Bei Raumtemperatur müssen die Schwingungskopplungen berücksichtigt werden, die dazu führen, daß bei allen Schritten etwas Energie in die Schwingungen des Moleküls und der Umgebung abgegeben wird.

Mathematisch werden die verschiedenen Wege mit Raten in den Einheiten s^{-1} beschrieben. Bei Raumtemperatur ist nur die Anregungsrate k_{12} , die das System in den angeregten Zustand befördert, von der Intensität des Anregungslichtes abhängig. Die Rate k_{21} entleert den angeregten Zustand direkt in den Grundzustand und die Intersystemcrossingrate k_{23} wechselt vom Singulett System in das Triplett System. Die Phosphoreszenzrate k_{31} führt zurück in den stabilen Singulettgrundzustand.

Im Experiment kann zwischen zwei Anteilen der Rate k_{21} , einem strahlenden Anteil k_{rad} und einem nichtstrahlenden Anteil k_{IC} unterschieden werden:

$$k_{21} = k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}. \quad (70)$$

Das Verhältnis der strahlenden Rate k_{rad} zur Summe aller Raten, die den angeregten Zustand S_1 entvölkern entspricht, der experimentell bestimmbaren Fluoreszenzquantenausbeute (siehe auch Gleichung (77)).

Im Hinblick auf die beabsichtigte Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe für den Einbau in Gast-Wirt-Systeme, und die Einzelmolekülspektroskopie sind folgende molekularen Daten von besonderem Interesse:

- Absorptionsspektrum mit Absorptionsquerschnitt oder Extinktionskoeffizient.
- Fluoreszenzspektrum mit Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer k_{21}
- Tripletttraten: Intersystemcrossingrate k_{23} und Triplettlebensdauer k_{31} .
- Photostabilität: Anzahl der emittierten Photonen N bis zum irreversiblen Bleichen.
- Molekularen Abmessungen

Diese Daten können mit der Hilfe der folgenden Methoden ermittelt werden:

3.1.2 Absorptionsspektren, Fluoreszenzanregungsspektren

Über den integralen Absorptionsquerschnitt σ läßt sich die dimensionslose Oszillatorstärke f berechnen, die für intensive (erlaubte) Übergänge maximal eins werden kann [Atkins1996].

$$f = \frac{4\pi\epsilon_0 c}{e^2} \int \sigma(\nu) d\nu \quad (71)$$

Andererseits hängt die Oszillatorstärke f mit dem molekular definierten Übergangsdipolmoment μ zusammen [Atkins1996]:

$$f = \frac{8\pi m_e \nu \cdot \vec{\mu}^2}{3 h e^2} \quad (72)$$

$$\vec{\mu}_{12} = \int \psi_2^* (-e \cdot \vec{r}) \psi_1 d\tau \quad (73)$$

Schließlich kann mit Gleichung (73) ein theoretischer Zusammenhang zwischen den quantenmechanischen Wellenfunktionen und dem im Experiment bestimmbaren Absorptionsquerschnitt hergestellt werden.

Die experimentelle Messungen von Absorptionsspektren wurden entweder mit einem Kontron UVIKON 860 oder mit einem Varian CARY 50 durchgeführt. Die von einer Probe der Dicke d und der Konzentration c durchgelassenen Lichtmenge folgt dem Gesetz von Lambert-Beer zu:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c d} \quad (74)$$

Dieser molare dekadische Extinktionskoeffizient ϵ ist eine von der Wellenlänge abhängige Stoffkonstante, die für intensive Farbstoffe Werte von über 100000 Liter/mol cm erreicht. Der molekular definierte Absorptionsquerschnitt σ , der die scheinbare Größe eines Farbstoffes für ein vorbeifliegendes Photon ist, kann aus dem dekadischen molaren Absorptionskoeffizienten berechnet werden:

$$\sigma = \frac{\ln 10 \cdot \epsilon [m^2/mol]}{N_A} \quad (75)$$

Dabei sind die Einheiten zu berücksichtigen, da der Absorptionskoeffizient üblicherweise für die Länge von 1 cm einer 1 molaren Lösung angegeben wird: $\epsilon [m^2/mol] = 0,1 \epsilon [L/mol \text{ cm}]$.

In verdünnten Proben werden Fluoreszenzanregungsspektren mit dem Fluoreszenzspektrometer CD900 von Edinburgh Analytical Instruments gemessen. Dabei wird mit einer Lichtquelle mit variabler Wellenlänge eingestrahlt und gegen die detektierte Fluoreszenzintensität aufgetragen. Da davon ausgegangen werden kann, daß die Fluoreszenzquantenausbeute eines Farbstoffes im gesamten Spektralbereich konstant ist, entspricht die Form eines Fluoreszenzanregungsspektrums genau der eines Absorptionsspektrums. Der Extinktionskoeffizient selbst kann jedoch damit nicht mehr bestimmt werden.

3.1.3 Fluoreszenzspektren

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wird der Farbstoff mit Licht angeregt und die Intensität des mit einem Gitter oder Prisma spektral zerlegten Fluoreszenzlichtes gemessen. Die Fluoreszenzspektren wurden entweder mit dem Fluoreszenzspektrometer CD900 von Edinburgh Analytical Instruments oder mit dem selbst entwickelten Prismen CCD Spektrometer (siehe Kapitel 2.6.2.3) direkt am konfokalen Mikroskop aufgenommen.

Fluoreszenzspektren können prinzipiell zwei Fehler enthalten. Zum einem kann die Wellenlängenachse verschoben sein, was aber mit monochromatischem Licht z.B. Laserpointer, Licht aus Neonröhren etc. leicht korrigiert werden kann; zum anderen kann die Intensitätsskalierung aufgrund der vielen wellenlängenabhängigen optischen Elemente wie Linsen, Gitter und Detektor fehlerhaft sein. Dieser Fehler ist nur mit aufwendig geeichten Lampen oder Detektoren korrigierbar. Das Fluoreszenzspektrometer CD900 besitzt eine elektronische Eichkurve, die aber vermutlich ungenau ist. Das Fluoreszenzmaximum kann aber hinreichend genau bestimmt werden, lediglich die Form des Spektrums ändert sich geringfügig.

3.1.4 Fluoreszenzlebensdauern

Unter der Fluoreszenzlebensdauer wird die Zeit τ verstanden, mit der das detektierbare Fluoreszenzsignal abklingt. Dabei sind alle Prozesse zu berücksichtigen, die den fluoreszierenden Zustand S_1 entvölkern:

$$\frac{1}{\tau} = k_{21} + k_{23} \quad (76)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer von organischen Farbstoffen liegt im Bereich von wenigen Nanosekunden. Nur in seltenen Fällen, wenn der Fluoreszenzvorgang verboten ist, kann es zu Fluoreszenzlebensdauern von einigen zehn Nanosekunden kommen. Die direkte Aufzeichnung des Signalverlaufs ist nur mit einer sehr aufwendigen "Streak-Kamera" möglich. Jedoch ist es relativ einfach möglich, den zeitliche Abstand von elektrischen Pulsen auf 1/100 Nanosekunde genau zu bestimmen. Die Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern wird daher meist mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC = Time correlated single photon counting) durchgeführt. Dabei wird die Farbstoffprobe mit einem so schwachen, aber kurzen Lichtblitz angeregt, daß danach maximal ein Fluoreszenzphoton vom Photodetektor registriert wird. Der Zeitunterschied zwischen dem Lichtblitz und dem detektierten Photon entspricht der Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffes. Diese Messung wird wiederholt bis ein statistisch signifikantes Ergebnis vorliegt (siehe Kapitel 2.6.2.4).

Für Zerfälle, die aus mehreren Exponentialkurven bestehen, ist zu beachten, daß eine multiexponentielle Anpassung nicht trivial ist und zu großen Fehlern führt, da die Amplituden und Zerfallsraten von Exponentialkurven voneinander stark abhängig sind [Grinvald1974].

3.1.5 Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Fluoreszenzquantenausbeute stellt den Anteil dar, der als Fluoreszenzstrahlung nach einer Anregung abgestrahlt wird. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Rate k_{21} nach Gleichung (70) aus einem strahlenden k_{rad} und einem nicht strahlendem Anteil k_{IC} bestehen kann:

$$\Phi = \frac{k_{rad}}{k_{21} + k_{23}} = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{IC} + k_{23}} \quad (77)$$

Fluoreszenzquantenausbeuten werden in der Regel durch Vergleiche mit bekannten Fluoreszenzfarbstoffen ermittelt. Dabei wird bei gleicher absorbierter Anregungslichtmenge und gleichbleibender Detektionseffizienz und Geometrie die Gesamtfluoreszenz durch Integration über das Fluoreszenzspektrum ermittelt [Parker1960]. Ein gebräuchlicher Farbstoff, der als Referenzprobe verwendet wird, ist Rhodamin 6G in Ethanol mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von 94%.

Um mit einer absoluten Methode ohne eine Vergleichssubstanz die Quanteneffizienz zu ermitteln, kann z.B. die Wärmeentwicklung in der Probe, die durch die fehlende Abstrahlung der Fluoreszenzphotonen entsteht, gemessen werden [Olmsted1997].

Die Methode mit der Referenzprobe wurde verwendet, um den Einfluß einer Oberfläche auf die Fluoreszenzquantenausbeute auf den Stilbenderivat-Farbstoff zu untersuchen. Als Vergleichsfarbstoff wurde ein Perylendiimid mit etwa 100% Fluoreszenzquantenausbeute gewählt. Bei gleicher optischer Dichte, bei der Anregungswellenlänge von 442 nm, beträgt die Fläche des Fluoreszenzspektrums des Stilbenderivats nur 9,6% von der des Perylendiimids. Nach der Zugabe von Silikatpulver (fumed silica) mit sehr großer Oberfläche steigt die Fläche des Fluoreszenzspektrums auf 35 % der Fläche von Perylendiimid. Aufgrund der Korrektur mit der optischen Dichte ist die Messung unabhängig von einer Konzentrationserhöhung an der Oberfläche durch Absorption. Abbildung 46 zeigt die Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute des Stilbenderivats im Vergleich zu Perylenfarbstoffen.

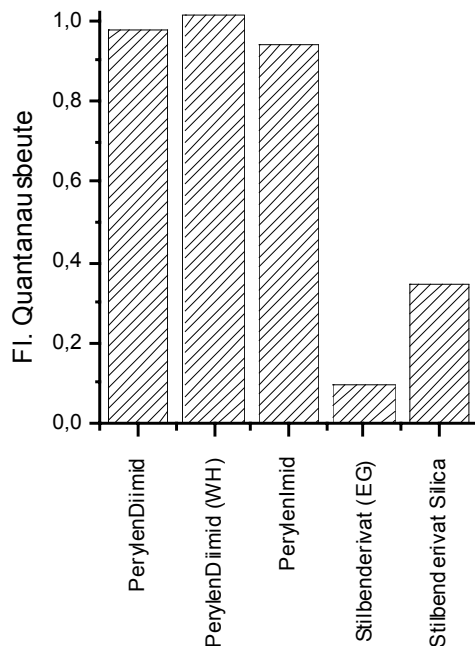


Abbildung 46: Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute des Stilbenderivats: In Ethylenglykol (EG) 9,6%, nach Zugabe von Silikatpulver 35%. Die drei Referenzmessungen besitzen eine Quantenausbeute von nahezu 100%.

3.1.5.1 Strickler und Berg -Methode zur Bestimmung von Quantenausbeute aus der natürlichen Lebensdauer

Nach Strickler und Berg [Strickler1962] kann die natürliche Lebensdauer aus gut aufgelösten Absorptions- und Fluoreszenzspektren abgeschätzt werden:

$$k_{rad} = \frac{2303 \cdot 8\pi n^2}{c^2 N_A} \frac{\int I_{FI} dv}{\int \frac{I_{FI}}{\nu^3} dv} \int \epsilon d \ln \nu \quad (78)$$

Mit der Hilfe von Gleichung (77) kann damit durch die Messung der Absorptions- und Emissionsspektren, der Fluoreszenzlebensdauer k_{21} , und Vernachlässigung von k_{23} , die Fluoreszenzquantenausbeute abgeschätzt werden.

3.1.6 Orientierungen

Aufgrund der Orientierung des Übergangsdipolmoments μ kann die Lage eines Farbstoffmoleküls bestimmt werden. Die Bestimmung der relativen Lage des Übergangsdipolmoments im Molekül erfolgt in der Regel durch quantenmechanische Berechnungen. Dabei wird die Ladungsverschiebung zwischen den Wellenfunktionen im Grundzustand und angeregten Zustand berechnet.

$$\vec{\mu}_{12} = \int \psi_2^*(-e \cdot \vec{r}) \psi_1 d\tau \quad (79)$$

Mit wenigen Ausnahmen liegt die Richtung des Übergangsdipolmoments für den langwelligsten Übergang immer entlang der größten Ausdehnung des delokalisierten Elektronensystems des Farbstoffes [Renn1988] [Lakowicz1999] [Baumann2000]. In hoch symmetrischen Molekülen mit drei- oder mehrfachen Drehachsen wie Triphenylen, Porphin oder Phthalocyanin ist ein zu einer Ebene entartetes Übergangsdipolmoment vorhanden. Ausnahmen bilden z.B. Tetracen und Pentacen, die ein Übergangsdipolmoment quer zur langen Molekülachse besitzen [Kruse1972] [Pariser1956]. Zur experimentellen Bestimmung des Übergangsdipolmoments müssen die Farbstoffmoleküle orientiert werden. Längliche Moleküle können durch ein Strecken von Polymerträgern, in die sie eingelagert werden, oder durch eine Einlagerung in Molekulkristalle orientiert werden. Wird die Orientierung des Chromophors nicht über die Absorption, sondern über die Fluoreszenzpolarisierung bestimmt, ist zu beachten, daß zwischen diesen Orientierungen durch Reorganisationsprozesse ein Winkel auftreten kann. Der Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment β kann jedoch durch Anisotropiemessungen an unorientierten, festen Proben bestimmt werden. Die Fluoreszenzanisotropie r mit der üblicherweise Rotationsprozesse bestimmt werden bezeichnet das Verhältnis von nach der polarisierten Anregung erhaltenem Polarisationsgrad zur Gesamtintensität:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (80)$$

Durch die Anregung mit polarisiertem Licht werden nicht nur die Moleküle, die parallel zur Anregungspolarisation liegen, sondern auch die verkippt liegenden Moleküle mit ihrem parallel liegenden Anteil mitangeregt. Strahlt ein solches verkippt liegendes Molekül Fluoreszenz ab, so hat dieses einen nicht verschwindenden Anteil der senkrecht zur Anregungspolarisation steht. Eine isotrope Verteilung der Moleküle ergibt eine Anisotropie von $r = 0,4$. Liegt die Emission senkrecht zum Anregungsdipolmoment, so sinkt die Anisotropie auf $r = -0,2$. Aus der Anisotropie kann direkt der Winkel β zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment bestimmt werden:

$$r = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (81)$$

Sind beim Absorptions- und Emissionsvorgang die gleichen quantenmechanischen Zustände beteiligt und sind Ladungsumorientierungen im angeregten Zustand aus Zeit- oder Symmetriegründen nicht vorhanden, so wird kein Winkelversatz erwartet.

3.1.7 Dunkelzustände von Farbstoffen

Alle Farbstoffe besitzen Dunkelzustände, in denen keine Fluoreszenzphotonen emittiert werden. Gut untersucht [Kulzer1999] [Fleury2000] ist jedoch nur der Triplettzustand, der quantenmechanisch erfaßt werden kann. Da bei allen Farbstoffen, die für Einzelmolekülmessungen verwendet werden, der Triplettzustand

die Messung erschwert, werden Farbstoffe ausgewählt, die möglichst selten diesen Dunkelzustand besetzen. An einem solchen Farbstoff ist dann jedoch die direkte Aufnahme von Phosphoreszenz-Abklingkurven sehr schwierig, da nur sehr wenig Phosphoreszenzlicht erhalten wird. Die Intersystemcrossingraten k_{23} vieler Farbstoffe liegen zwischen 10^6 s^{-1} und 10^7 s^{-1} [Depster1972], für Terrylen in p-Terphenyl bei 1,4 K wurden mit $0,4 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ aber auch schon sehr niedrige k_{23} Raten gefunden [Kummer1996]. Die Phosphoreszenzzerfallsraten k_{31} organischer Farbstoffe liegen im Bereich von 10^3 s^{-1} . Kann jedoch ein Triplettquenscher wie Sauerstoff in die Nähe des Farbstoffes gelangen, so werden viel größere Raten, die im Bereich von 10^6 s^{-1} liegen gefunden [Wöhrle1998] [Kasche1964].

Auch durch gepulste Experimente mit zwei Farben und Detektion der Fluoreszenz sind die Raten in und aus dem Triplett zugänglich. Dabei wird mit einer Farbe der S_1 -Zustand besetzt, während die andere Farbe zur Entvölkerung des T_1 Zustandes dient. Obwohl eine solche Untersuchung bei Beachtung der Beleuchtungsgeometrie auch mit vielen Molekülen möglich wäre, ist nur eine Messung an einzelnen Molekülen bekannt [English2000].

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) detektiert jegliche Dynamik des Fluoreszenzsignals. Doch nur wenn sehr wenige Moleküle detektiert werden, ist aufgrund der nicht vorhandenen zeitlichen Korrelation zwischen den Molekülen eine Intensitätsschwankung vorhanden. Abbildung 47 zeigt eine typische durch den Triplettzustand hervorgerufene FCS Meßkurve eines immobilisierten TDI Farbstoffmoleküls.

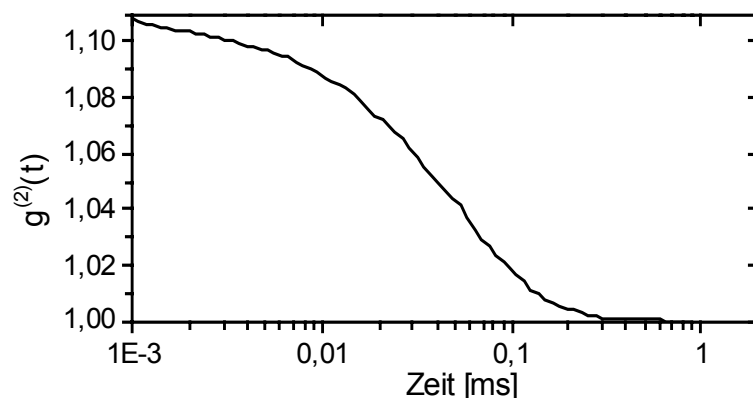


Abbildung 47: Typische FCS Meßkurve eines immobilisierten TDI Farbstoffmoleküls mit einer Triplettlebensdauer von 67 μs .

Die Methode zur Ermittlung von Tripletttraten aus FCS-Zerfallskurven wird in Kapitel 2.6.2.2.2 erläutert. In Kapitel 4.4.3 werden verschiedene Messungen der Tripletttraten durchgeführt.

Mit FCS in Lösung ist ein detektierbarer Zeitbereich von ns bis ms zugänglich, der nach unten durch die Statistik und nach oben durch die mittlere Dauer, die das Farbstoffmolekül durch das Detektionsvolumen diffundiert, limitiert ist.

Die Auswertung von Quantensprüngen in Fluoreszenzzeitspuren einzelner Moleküle erlaubt eine direkte Ermittlung der Fluoreszenzdynamik [Basche1995]. Um aus einer Zeitspur die An- und Auszeiten sicher zu extrahieren, muß der Abstand der

detektierten Photonen in der Anphase mindestens eine Größenordnung kleiner sein als die Dauer der An- und Auszeit. Konkret bedeutet dies, daß bei einem Molekül mit einer Triplettlebensdauer von 50 μ s Detektionsraten von über 500 000 Photonen pro Sekunde nötig sind. Ein Beispiel für diese Meßmethode wird in Kapitel 4.4.2 demonstriert.

3.1.8 Photostabilität

Die Rolle von Sauerstoff beim Bleichen von Farbstoffmolekülen ist zwiespältig. Einerseits ist Sauerstoff ein effizienter Quencher für den Triplettzustand, der dadurch kürzere Zeit für ungewollte Reaktionen zur Verfügung steht und zugleich wird die Signalintensität erhöht, andererseits ist der entstehende Singulett Sauerstoff sehr reaktiv und kann das Molekül selbst angreifen. So ist z.B. Coumarin-120 in einer sauerstofffreien Lösung gegenüber mit Luft gesättigter wäßriger Lösung fast dreimal photostabiler, während Coumarin-307 in der sauerstofffreien Lösung über 40 mal instabiler ist [Eggeling1998]. Die genaue photophysikalische Beschreibung des Bleichvorgangs ist dabei oft ungewiß. So ist nicht bekannt, ob der eigentliche Bleichvorgang vom S_1 oder vom T_1 Zustand ausgeht. Messungen an TDI in Kapitel 4.4.3 deuten darauf hin, daß k_{23} nicht mit dem Bleichvorgang korreliert, was durch einen Bleichvorgang aus dem S_1 Zustand erklärt werden kann.

Als Parameter für die Photostabilität wird die Anzahl N der emittierten Fluoreszenzphotonen gewählt.

Zur Ermittlung der Photostabilität stehen mehrere Methoden zur Verfügung.

Als direkte Methode wird die Aufnahme von digitalen Bleichspuren von einzelnen Molekülen verwendet. Bei dieser Methode sind außer der Detektionseffizienz des Mikroskops und der Fluoreszenzquantenausbeute keine weiteren Parameter erforderlich. Jedoch muß das Molekül mindestens einige Zeit überleben, da erst dessen Position genau bestimmt werden muß. Aufgrund dieser Einschränkung scheidet jedoch viele Moleküle für diese Untersuchungsmethode aus.

Ein anderes Experiment verwendet eine Lösung des Farbstoffes, die in einer gerührten Küvette mit einer starken Lichtquelle beleuchtet wird. Aus der Zunahme des transmittierten Lichtes oder der Abnahme der Fluoreszenz kann die Photostabilität berechnet werden [Eggeling1998b]. Die Ergebnisse dieser Bleichmessungen sind stark vom verwendeten Lösungsmittel, der Farbstoffkonzentration und dem Sauerstoffgehalt abhängig. Daher sind sowohl die Methode, als auch deren Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Festkörper übertragbar.

Es wurde daher eine Methode entwickelt, um im Festkörper, möglichst im konfokalen Volumen des Mikroskops, Bleichmessungen durchzuführen. Strahlt man mit einem konfokalen Mikroskop in eine gleichmäßig fluoreszierende Festkörperprobe ein, so werden die Farbstoffe gemäß dem Intensitätsverlauf des Anregungslasers geblichen. Abbildung 48 zeigt die Geometrie des Versuches.

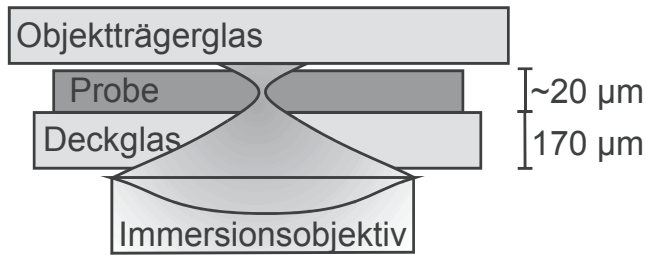


Abbildung 48: Experimentelle Anordnung zur Aufnahme von Bleichkurven im konfokalen Mikroskop.

Bei einem, im einfachsten Modell, monoexponentiellem Bleichen der Farbstoffmoleküle mit der Bleichzeit k ergibt sich folgende 3-dimensionale Farbstoffverteilung im Laserfokus mit der Lichtverteilung I :

$$c(x, y, z, t) = c_0(x, y, z) \cdot e^{\frac{-t}{k} I(x, y, z)} \quad (82)$$

Die dreidimensionale Lichtverteilung $I(x, y, z)$ lässt sich mit der in Kapitel 2.5.1.1 angegebenen Gleichungen (28) (29) genähert berechnen. Nur genau im Zentrum des Laserfokus bleichen die Farbstoffmoleküle mit der Bleichzeit k . Außerhalb des Fokus ist eine geringere Lichtintensität vorhanden, wodurch die Moleküle dort auch langsamer bleichen.

Die nach dem Bestrahlen entstehende Farbstoffverteilung lässt sich auch mit einem konfokalen Fluoreszenzbild aufnehmen:

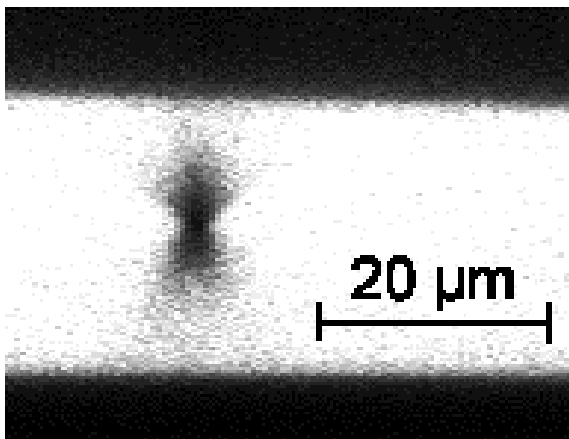


Abbildung 49: Konfokaler Querschnitt von lokal geblichenem Farbstoff. $\lambda = 633 \text{ nm}$ $NA = 1,3$.

Die Stärke der Fluoreszenz während des Bleichvorganges hängt wiederum von der Konzentration und der Anregungsleistung ab:

$$I_f(x, y, z, t) = c(x, y, z, t) \cdot I(x, y, z) \quad (83)$$

Um das Signal des Detektors zu erhalten, muß die Lichtmenge bestimmt werden, die das Detektionsspinhole passiert. Dazu muß die Detektionsfunktion I_{fl} angewandt und das Integral über den gesamten Raum gebildet werden:

$$Signal(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I(x,y,z) \cdot I_{fl}(x,y,z,t) dx dy dz \quad (84)$$

Die Detektionsfunktion entspricht bei geschossenem Detektionsspinhole den Anregungsfunktionen (28) (29). Um die Abhängigkeit des Pinholes zu untersuchen, wird ein Faktor eingeführt, der die Größe des Fokus verbreitert. Dadurch entspricht dieser Faktor in etwa der Größe des Pinholes in Airy Einheiten.

Da die gesamte Funktion (84) analytisch nicht lösbar ist, wird mit dem Programm MathCAD numerisch integriert. Es wird eine Probe mit $n = 1,5$, ein Objektiv mit einer NA von 1,3 und eine Wellenlänge von $0,633 \mu\text{m}$ angenommen. Da das Programm nicht mit unendlichen oder sehr großen Integrationsgrenzen zurecht kommt (bei größere Grenzen werden unsinniger Weise geringere Intensitäten erhalten), wird der maximale Radius auf $6 \mu\text{m}$ und die z-Grenze auf $20/2 \mu\text{m}$ festgelegt. Obwohl die überwiegende Signalintensität bei erstaunlich großem Abstand im Vergleich zu dem sehr kleinen Fokus gefunden wird, sind bei diesen Integrationsgrenzen die Integrale schon sehr konstant. Dies bedeutet, daß die wenigen und schnell bleichenden Moleküle exakt im Zentrum des konfokalen Volumens nur wenig zum gesamten Signal beitragen. Entscheidend sind vielmehr die vielen Moleküle am Rand des Detektionsvolumens. Da die Zeitinformation nur in dem Verhältnis t/k in der Gleichung (82) enthalten ist, skaliert die Zeit der Kurvenverläufe linear mit der Bleichzeit k . Es ist daher möglich, alleine aus der Zeit, bei der die Kurve z.B. auf die Hälfte des Anfangswertes abgefallen ist, die Bleichzeit zu bestimmen ohne jedesmal den exakten Kurvenverlauf zu simulieren. Abbildung 50 zeigt, daß sich die Form der Bleichkurven für drei verschiedene Bleichzeiten k nicht verändert.

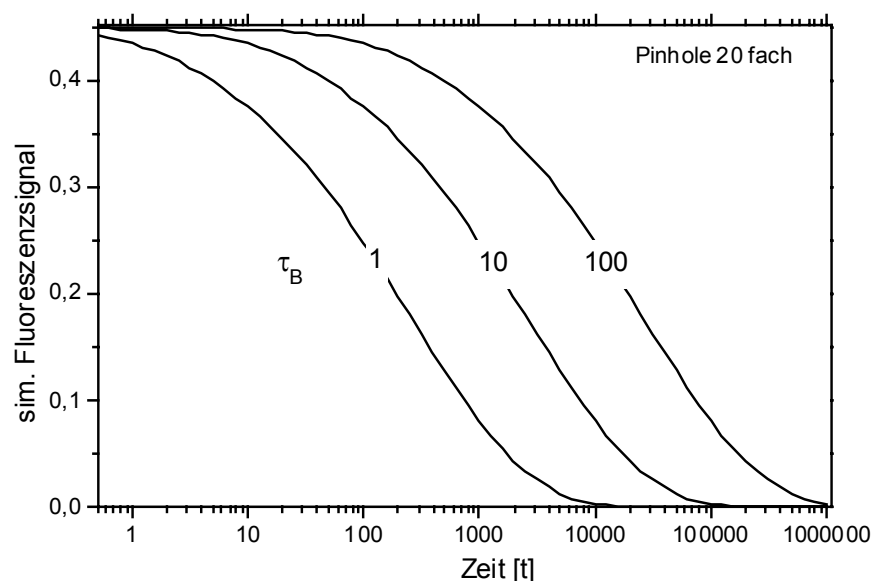


Abbildung 50: Simulierter Intensitätsverlauf der konfokalen Bleichkurven bei verschiedenen Bleichzeiten k .

Es wird nun der von der Geometrie abhängige Parameter durch Simulationen bestimmt, um die Zeit bis zur halben Anfangsintensität in die Bleichzeit k der Farbstoffmoleküle umzurechnen. Bei Messungen im Experiment hat sich herausgestellt, daß eine geringfügige Verschiebung von Anregungs- und Detektionsfunktion aufgrund von Dejustage oder von unterschiedlichen Fokallängen des Objektivs für verschiedene Wellenlängen nicht vermeidbar ist. Daher werden nur dann reproduzierbare Bleichkurven erhalten, wenn das Detektionspinhole ganz geöffnet ist. Bei dem 40x1,3 Öl-Objektiv entspricht ein ganz geöffnetes Pinhole von 445 μm etwa 20 Airy Durchmessern. Abbildung 51 zeigt verschiedene simulierte Bleichkurven mit verschieden großem Pinhole.

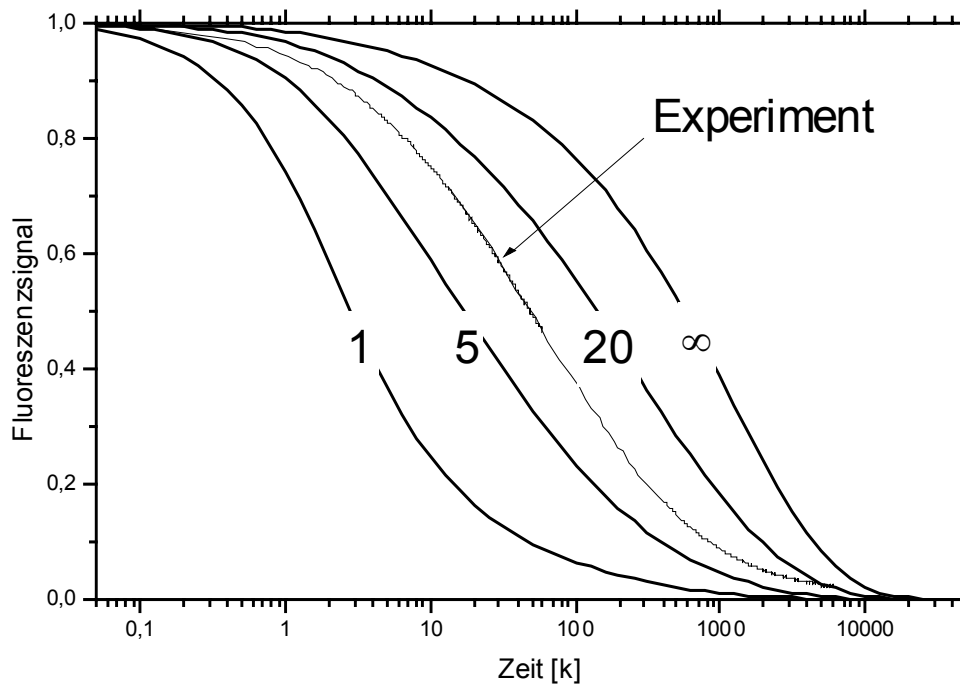


Abbildung 51: Simulierter Intensitätsverlauf der konfokalen Bleichkurven in Abhängigkeit der Pinholegröße in Airy Einheiten. Zum Vergleich ist in der Mitte eine experimentell bestimmte Bleichkurve eingezeichnet.

Bei kleinem Pinhole fällt die Kurve bei kleinen Zeiten sehr schnell ab, während bei sehr großem die größte Abnahme erst am Ende erreicht wird. Die in der Abbildung ebenfalls aufgeführte experimentelle Bleichkurve paßt von der Form gut zu den mittleren Pinholegrößen (Die zeitliche Übereinstimmung ist Zufall). Daraus kann geschlossen werden, daß trotz der genäherten Abbildungsfunktionen nach den Gleichungen (28) (29) sinnvolle Simulation erhalten werden. Das gesuchte Verhältnis $t_{1/2} : k$ kann für verschiedenen Pinholegrößen aus der Abbildung 52 abgelesen werden.

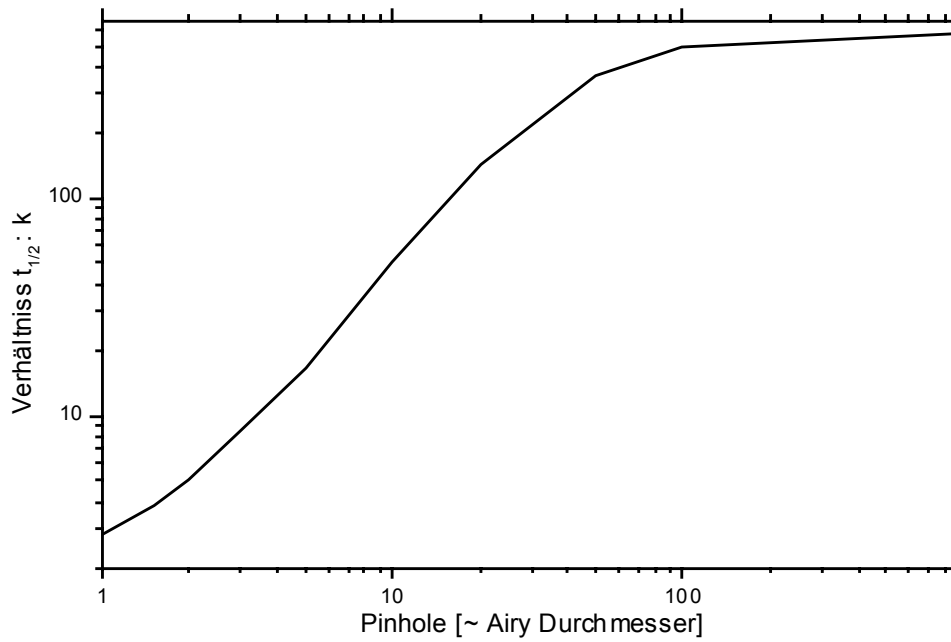


Abbildung 52: Verhältnis der experimentellen Halbleichzeit $t_{1/2}$ zur Molekülbleichzeit k in Abhängigkeit von der Pinhole Größe.

Für eine weit geöffnete Pinholegröße von etwa 20 Airy Größen wird ein Verhältnis $t_{1/2} : k = 140$ ermittelt. Um diesen Faktor bleichen die Farbstoffmoleküle im Zentrum des Fokus schneller als das detektierte Signal. Eine abschließende Simulation zeigt den Einfluß der Probendicke. Dazu wird die Integration in der Simulationsgleichung (84) in der z-Richtung eingeschränkt. Abbildung 53 zeigt den Einfluß der Schichtdicke auf das Umrechnungsverhältnis $t_{1/2} : k$.

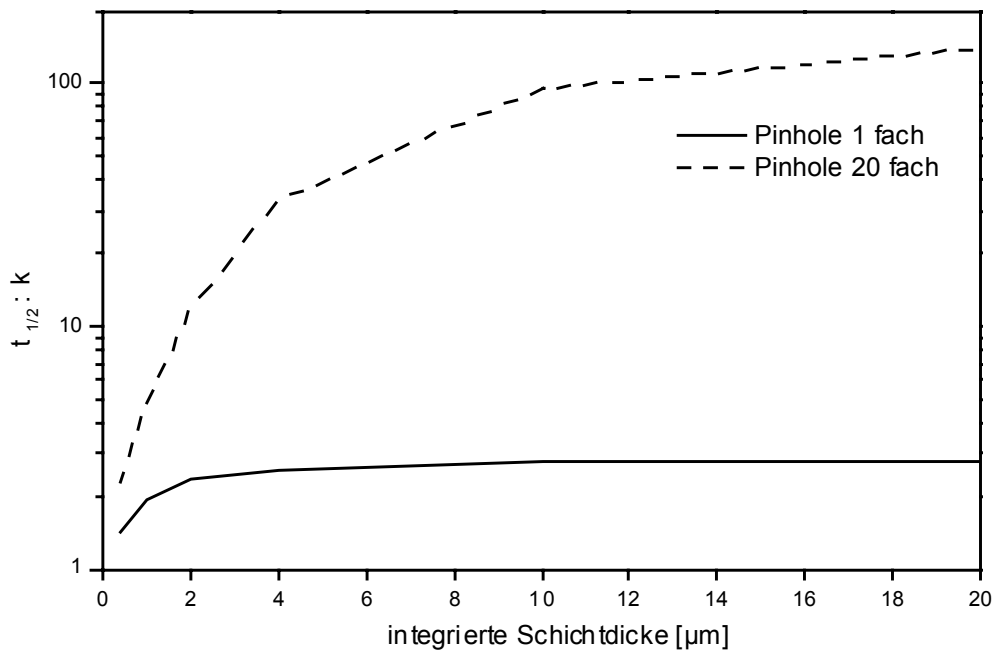


Abbildung 53: Abhängigkeit der Probendicke auf das Umrechnungsverhältnis. Gezeigt ist das Verhältnis $t_{1/2}$ zu k für ein sehr kleines und ein sehr großes Pinhole.

Bei einem kleinen Pinhole sollte die Probe mindestens $4 \mu\text{m}$ dick sein, bei dem großen Pinhole sind aber mindestens $15 \mu\text{m}$ nötig, um ein von der Probendicke unabhängiges Verhältnis zu erhalten.

Für das Experiment wird ein mindestens $20 \mu\text{m}$ dicker Film mit einer Konzentration von etwa 10^{-6} mol/l auf einem Deckglas hergestellt und der Fokus des Immersionsobjektives so eingestellt, daß er etwa $10 \mu\text{m}$ tief in der Probe liegt (siehe Abbildung 48). Zur Aufnahme der Meßkurve wird der Laser erst während der Messung gestartet, da das Mikroskop schon vor der Messung den Laser aktiviert, die Intensität zu Beginn des Bleichens aber unbedingt zum Auffinden der halben Signalhöhe benötigt wird.

Berücksichtigt man die von der Laserleistung I abhängige Anregungsrate im Fokus nach Gleichung (61), die Umrechnung des Absorptionsquerschnitts (59), die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_{fl} , und die mittlere Bleichzeit k , so erhält man die Anzahl der emittierten Photonen bis zum Bleichen:

$$N = 6,5 \left[\frac{\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{m}}{\text{Liter} \cdot \text{W} \cdot \text{s}} \right] \frac{\Phi_{fl} \cdot I \cdot k \cdot \epsilon \cdot NA^2}{\lambda} \quad (85)$$

Bei der Verwendung von $NA = 1,3$ und einem Umrechnungsverhältnis für ein offenes Pinhole von $t_{1/2} : k = 140$ ergibt sich:

$$N = 78 \left[\frac{\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{nm}}{\text{Liter} \cdot \mu\text{W} \cdot \text{s}} \right] \frac{\Phi_{fl} \cdot I \cdot t_{1/2} \cdot \epsilon(\lambda)}{\lambda} \quad (86)$$

Die Methode kann mit den Photonenmessungen an einzelnen TDI-Molekülen verglichen werden. Von diesen Molekülen ist aus den Messungen in Kapitel 4.4.4 bekannt, daß sie in PMMA als Matrix im Mittel $2 \pm 0,3 \cdot 10^{10}$ Photonen emittieren. Im Bleichexperiment wurde an einer 20 μm dicken Probe mit einer Bestrahlung von 34 μW nach 61000 s das halbe Fluoreszenzsignal detektiert. Mit $\Phi_f = 1$ und $\varepsilon(633 \text{ nm}) = 41800 \text{ [L/mol cm]}$ erhält man folgende Korrekturgleichung:

$$N \approx 140 \left[\frac{\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{nm}}{\text{Liter} \cdot \mu\text{W} \cdot \text{s}} \right] \frac{\Phi_f \cdot I \cdot t_{1/2} \cdot \varepsilon(\lambda)}{\lambda} \quad (87)$$

Die Abweichung um einen Faktor von weniger als 2 zwischen den beiden Experimenten kann an verschiedenen Gründen liegen. Im Einzelmolekülexperiment ist sicherlich die angenommene Einsammeleffizienz von $\sim 3\%$ der unsicherste Parameter, in der Simulation ist die Berücksichtigung des großen Pinholes der unsicherste Einfluß. Für die Bestimmung der Anzahl der detektierbaren Photonen eines Moleküls wird daher als Kompromiß ein Wert von $100 \pm 50 \text{ [mol cm nm / Liter } \mu\text{W s]}$ angenommen.

Die Einheit des Parameters wurde so gewählt, daß die Lichtleistung P in [μW], die Wellenlänge λ in [nm] und der wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient $\varepsilon(\lambda)$ in den üblichen [Liter / mol cm] eingesetzt werden kann.

Abbildung 54 zeigt die Ergebnisse einer Reihe von durchgeführten Bleichmessungen.

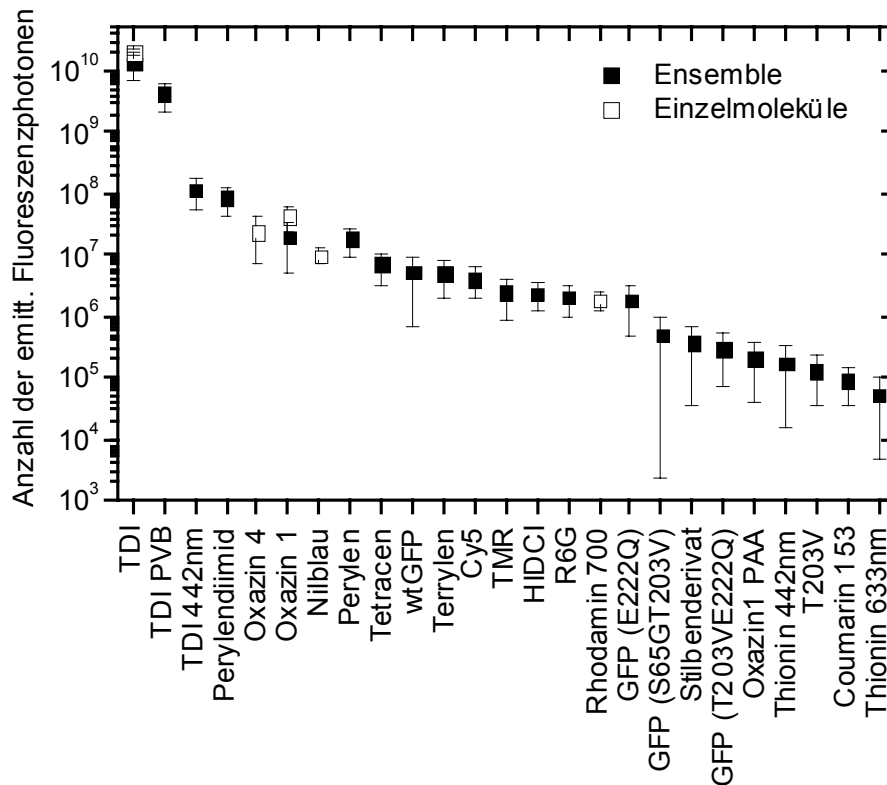


Abbildung 54: Die Anzahl der emittierten Photonen bis zum Photobleichen von verschiedenen Farbstoffen. Die Werte mit den ausgefüllten Symbolen wurden durch Bleichen von vielen Farbstoffmolekülen im konfokalen Mikroskop ermittelt. Zum Vergleich sind einige Messungen an einzelnen Molekülen aus Kapitel 4.4.4 als offene Symbole eingetragen.

Die ermittelten Photonenzahlen besitzen je nach Fehler in der Messung und der vorhandenen Molekülparameter etwa die Genauigkeit von einer Größenordnung. Als Matrix wurde für die GFP Moleküle ein Polyacrylamidgel und sonst, wenn nicht anders angegeben, PMMA verwendet. Für einige Moleküle werden ungewöhnlich hohe Photonenzahlen ermittelt (einige GFP-Varianten, HIDCI), jedoch ist zu berücksichtigen, daß Effekte wie Blinken oder die Bildung von Photoprodukten, die an einzelnen Molekülen beobachtet werden, von der Anregungsleistung und der Meßzeit abhängig sind. An dem Farbstoff TDI wird eine wellenlängenabhängige Photostabilität beobachtet. Bei einer kurzwelligen Anregung mit 442 nm bleicht TDI etwa 100 mal schneller als bei einer Anregung mit 633 nm.

3.1.9 Größe der Farbstoffe

Um abzuschätzen, welcher Farbstoff in eine vorgegebene Pore paßt, müssen die Größen der Farbstoffmoleküle bestimmt werden. Geometrisch paßt ein Molekül in eine zylindrische Röhre, wenn zwei Dimensionen nicht größer als der Röhrendurchmesser sind. Da alle Farbstoffe aus einem flachen π -System aufgebaut sind, ist die "Höhe" als zweitkleinste Dimension von Interesse. Die Atomabstände in den Farbstoffmolekülen wurden mit sinnvollen Strukturformeln und bekannten Bindungsabständen (siehe Tabelle Atomabstände [Dewar1977]) berechnet. Anschließend muß zu den Randatomen noch deren Van-der-Waals Radius (siehe Tabelle Van der Waals Radien [Bondi1964]) hinzugefügt werden.

Bindung	Länge [pm]
sp ³ C-H	109
sp ² C-H	108,6
spC-H	106
sp ³ C-sp ³ C	154
sp ³ C-sp ² C	150
sp ² C-sp ² C	146
sp ² C=sp ² C	134
sp=sp	120
C-O	142
C=O	122

Tabelle Atomabstände [Dewar1977].

Gruppe	Van-der-Waals Radius [pm]
H	120
CH ₃	200
N	155
O	152
S	180
F	147
Cl	175
Br	185

Tabelle Van der Waals Radien [Bondi1964].

Die so ermittelten Größen der Farbstoffmoleküle besitzen etwa eine Genauigkeit von 10%. Eine höhere Genauigkeit ist nicht unbedingt nötig, da Molekulardynamik-Rechnungen zeigen, daß sowohl Farbstoff als auch Zeolithe bei Raumtemperatur starke Deformationsschwingen ausführen, die auch größeren Molekülen die Diffusion in engen Kanälen erlaubt [Jäger2002]. Die Molekülgrößen von TDI (2 Aromaten hoch = 0,91 nm) und Tetracen (1 Aromat hoch = 0,72 nm) wurden auch von I. Frank berechnet und passen gut zu den hier abgeschätzten Größen.

3.1.10 Parameter ausgewählter Farbstoffe

Eine tabellarische Zusammenfassung weiterer untersuchter Moleküle befindet sich im Anhang.

3.1.10.1 TDI

Der Farbstoff TDI (**TerrylenDilmid**) ist ein Derivat des polycyclischen Aromaten Terrylen, dem zwei verschiedene Imidgruppen zur Verbesserung der Löslichkeit und zur spektralen Verschiebung in den roten Spektralbereich angehängt wurden [Holtrup1997]. Der Farbstoff wurde uns vom Arbeitskreis Müllen (Mainz) zur Verfügung gestellt [Mais1997].

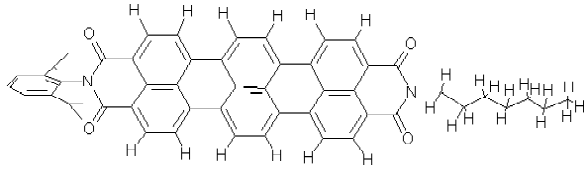


Abbildung 55: Strukturformel von TDI

Abbildung 55 zeigt die chemische Struktur von TDI. Die Breite des Moleküls, die für eine Einlagerung in eine Röhre bestimmend ist, beträgt 0,91 nm. Abbildung 56 zeigt das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum einer Lösung von TDI in CHCl_3 .

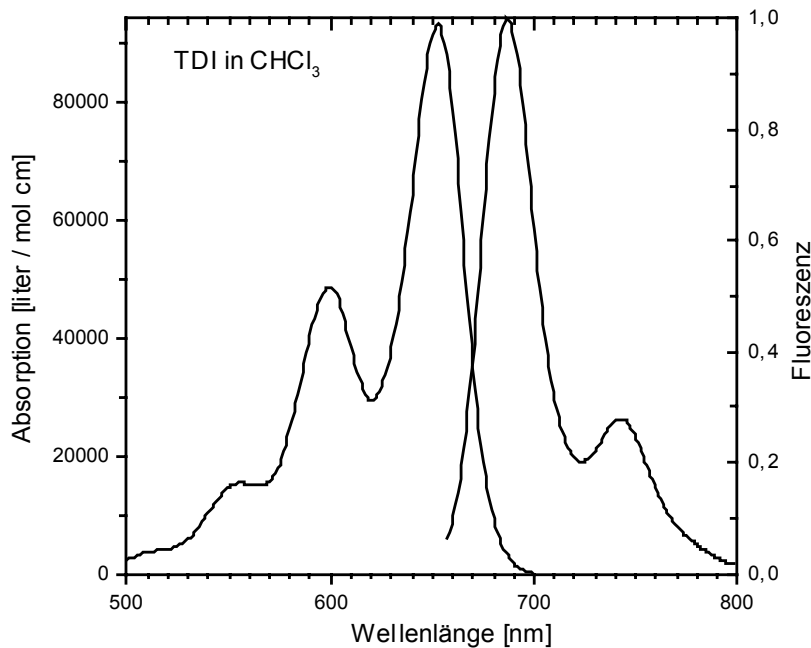


Abbildung 56: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von TDI in Chloroform.

Das Fluoreszenzmaximum bei 670 nm verschiebt sich bei einer PMMA Matrix etwas auf 663 nm. Die charakteristische Schwingungsbande in der Fluoreszenz besitzt eine mittlere Energie von 1300 cm^{-1} . Die im Lösungsmittel CHCl_3 experimentell ermittelte Fluoreszenzlebensdauer liegt bei 3,4 ns. Die Fluoreszenzquantenausbeute wird mit 100 % angegeben. Bei nicht zu intensiver Anregung bleicht der Farbstoff erst nach $2 \pm 0,3 \cdot 10^{10}$ Photocyclen (siehe Kapitel 4.4.4). Dabei bildet sich in geringen Mengen ein Photoprodukt, dessen Fluoreszenzmaximum bei 561 nm liegt (siehe Kapitel 4.7.3).

$\sigma(633 \text{ nm})$	$1,6 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$
$k_{\text{rad}} = k_{21}$	$2,9 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$. (3,5 ns)
k_{23}	$\sim 45000 \text{ s}^{-1}$. (Kapitel 4.4.3)
k_{31}	~ 16000 oder 28000 s^{-1} . Zwei Populationen (Kapitel 4.4.3)
Photozyklen	$2 \cdot 10^{10}$
Sättigung der Fluoreszenz:	$\sim 60 \text{ kW/cm}^2$ bei 633 nm
Größe	0,5 nm 0,91 nm 2 nm.

3.1.10.2 Oxazin 1

Ein typischer Phenoxazin Farbstoff ist Oxazin 1 (7-(Diethylamino)-3-(diethylimmonium)-3H-phenoxazinperchlorat, Lambda Physics), bei dem die beiden Aminogruppen als Diethylamine geschützt werden. Die chemische Strukturformel ist in Abbildung 57 dargestellt.

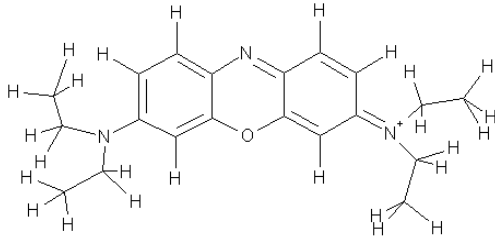


Abbildung 57: Strukturformel von Oxazin 1.

Das Perchlorat Gegenion ist nicht eingezeichnet. Die Höhe des Moleküls beträgt ~0,87 nm, da die Ethylgruppen nicht frei rotiert werden können. Abbildung 58 zeigt das Absorptionsspektrum in Ethanol mit einem Maximum bei 645 nm ($\epsilon \sim 130000$ [L / mol cm]) und das Fluoreszenzspektrum mit einem Maximum bei 670 nm.

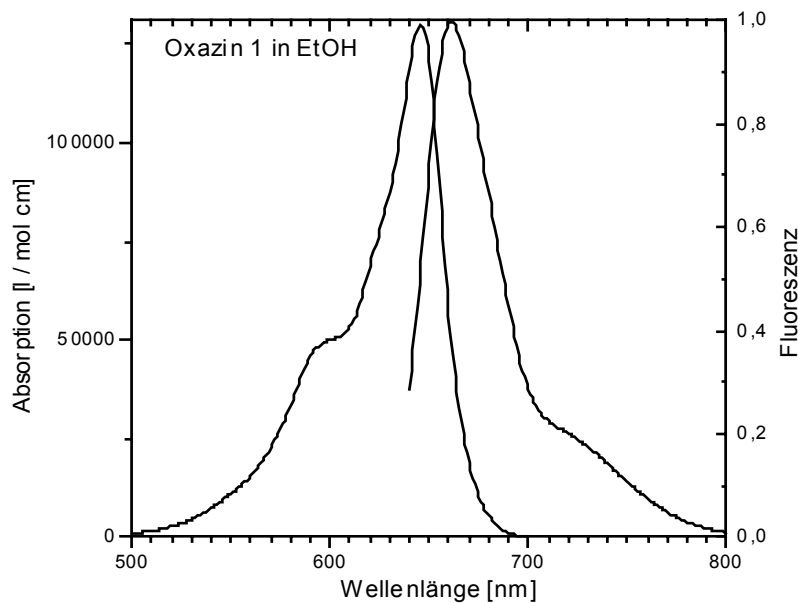


Abbildung 58: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Oxazin 1 in Ethanol.

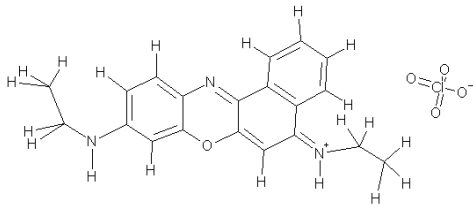
Die experimentell ermittelte Fluoreszenzzerfallszeit beträgt in Ethanol 0,85 ns, in Wasser sinkt dieser Wert auf 0,5 ns, in CHCl₃ steigt er auf 1,3 ns (siehe auch [Landgraf1996]). Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt in Ethanol 11%, in Ethylenglykol 19% [Sens1981], in Wasser ~7% und in PMMA und CHCl₃ etwa 16%.

$\sigma(633 \text{ nm})$	$3,5 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$
k_{rad}	$\sim 1,3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$
k_{21}	$2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ (Wasser), $1,2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ (Ethanol), $8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (PMMA, CHCl ₃)
k_{23}	$\sim 26000 \text{ s}^{-1}$
k_{31}	$\sim 70000 \text{ s}^{-1}$ PMMA/Luft

Photozyklen	$2 \cdot 10^7$
Sättigung der Fluoreszenz:	$\sim 30 \text{ kW/cm}^2$ bei 633 nm
Größe	0,5 nm 0,87 nm 1,8 nm

3.1.10.3 Oxazin 170

In Oxazin 170 (9-Ethylamino-5-ethylimino-10-methyl-5H-benzo(a)phenoxazonium Perchlorate, Lambda Physics) ist ein zusätzlicher aromatischer Ring am Chromophor vorhanden. Abbildung 59 zeigt die chemische Strukturformel.



Die Höhe des Moleküls beträgt etwa 1,0 nm. Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind in Abbildung 60 dargestellt.

Abbildung 59: Strukturformel von Oxazin 170.

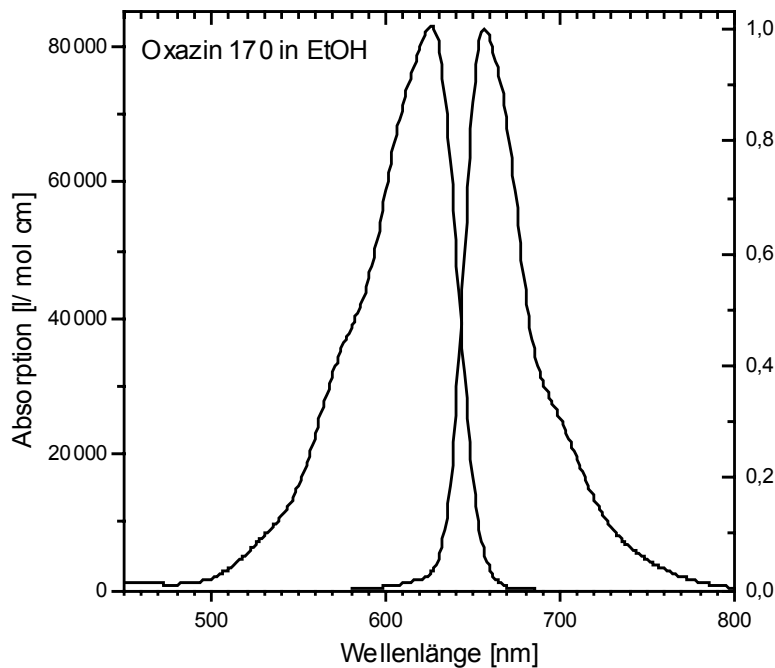


Abbildung 60: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Oxazin 170 in Ethanol.

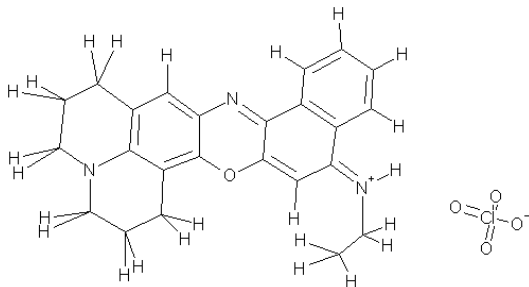
Das Absorptionsmaximum liegt bei 625 nm ($\epsilon \sim 83000 \text{ [L / mol cm]}$), so daß eine Anregung mit 633 nm gerade noch möglich ist. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei 658 nm.

Die Fluoreszenzquantenausbeute wird mit 63% angegeben [Sens1981], die Fluoreszenzlebensdauer beträgt in Ethanol $\sim 3,2 \text{ ns}$ [Landgraf2002].

$\sigma(633 \text{ nm})$	$2,4 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$
k_{rad}	$\sim 2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$
k_{21}	$3,1 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (3,2 ns)
k_{23}	$\sim 14000 \text{ s}^{-1}$ (in $\text{AlPO}_4\text{-5}$)
k_{31}	$\sim 400 \text{ s}^{-1}$ (in $\text{AlPO}_4\text{-5}$)
Sättigung der Fluoreszenz	$\sim 4 \text{ kW/cm}^2$ bei 633 nm
Größe	0,4 nm 1 nm 1,8 nm

3.1.10.4 Oxazin 750

In Oxazin 750 wird, im Vergleich zu Oxazin 170, eine Aminogruppe über zwei Ringe fixiert.



Dadurch soll die Beweglichkeit im Molekül verringert und die Quantenausbeute erhöht werden. Die Höhe des Moleküls ist mit 1,1 nm etwas größer als Oxazin 170. In Ethanol ist die maximale Absorption mit $\epsilon \sim 83000 \text{ [L / mol cm]}$ bei 667 nm und das Maximum der Fluoreszenz bei 678 nm zu finden (siehe Abbildung 62).

Abbildung 61: Strukturformel von Oxazin 750.

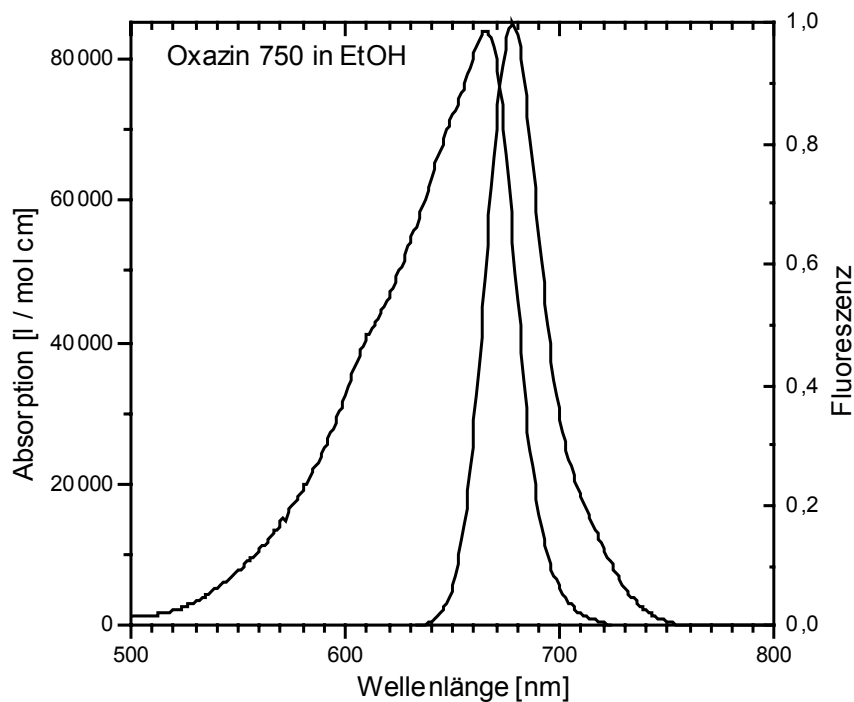


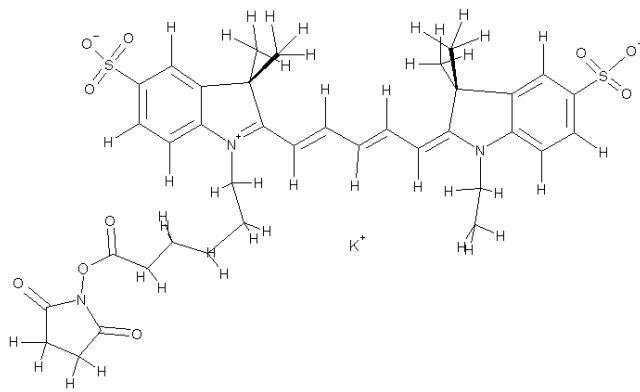
Abbildung 62: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Oxazin 750 in Ethanol.

Es wird in Ethylenglykol eine Fluoreszenzlebensdauer von 1,9 ns gemessen.

$\sigma(633 \text{ nm})$ $2,3 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$
 k_{rad} $\sim 2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$
 k_{21} $5,3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (in Ethylenglykol)
 Größe 0,4 nm 1,1 nm 1,6 nm

3.1.10.5 Cy5

Der Cyaninfarbstoff Cy5 (Cy5-bis-OSU, N,N'-biscarboxypentyl-5,5'-disulfonatoindodicarbocyanine, Amersham Life Science) wird häufig in der Biochemie verwendet, um Proteine zu markieren. Das Molekül besitzt dazu eine Kupplungsgruppe, die an eine freie Aminogruppe gebunden werden kann. In dieser Arbeit wird der Farbstoff damit an die innere Porenwand kovalent angebunden. Abbildung 63 zeigt die chemische Struktur des Farbstoffes.



Die Höhe des Chromophors beträgt etwa 1,25 nm. Im Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 64) liegt das Maximum mit $\epsilon \sim 220000 \text{ [L / mol cm]}$ bei 650 nm, und das Emissionsmaximum bei 675 nm.

Abbildung 63: Strukturformel von Cy5.

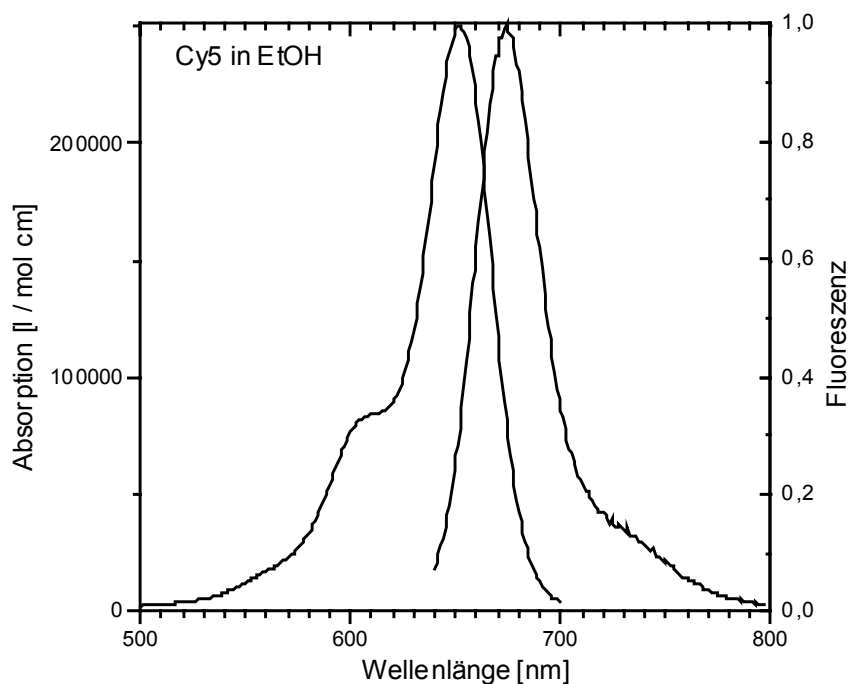


Abbildung 64: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Cy5 in Ethanol.

Die gemessenen Fluoreszenzzerfallszeit beträgt in Ethanol 1,5 ns. Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt etwa 30 %. Ein in PMMA eingebettetes Farbstoffmolekül bleicht nach etwa $4 \cdot 10^6$ emittierten Photonen irreversibel. In reinem Wasser wird der erheblich geringere Wert von 200000 Photocyclen gefunden [Eggeling1998]. Neben dem Triplettzustand ist noch ein weiterer Zustand vorhanden, der vermutlich auf einer cis-trans Isomerisierung der Alkenbrücke beruht [Widengren2000].

$\sigma(633 \text{ nm})$	$6 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$
k_{rad}	$\sim 2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$
k21	$6,7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (1,5ns in Ethanol)
k23	54000 s^{-1} (eigene Messung, PMMA/Luft)
k31	24000 s^{-1} (eigene Messung, PMMA/Luft)
Photozyklen	$4 \cdot 10^6$
Sättigung der Fluoreszenz	$\sim 8 \text{ kW/cm}^2$ bei 633 nm
Größe	0,5 nm 1,25 nm 2,3 nm

3.1.10.6 Stilbenderivat

Der Stilbenderivat-Farbstoff (4-(4-Diethylaminostyryl)-N-methyl-pyridinium-iodide, Sigma D-3418) wird in dieser Arbeit verwendet, um Fehlstellen in Kristallen anzufärben. Aus der Strukturformel geht hervor, daß der Farbstoff eine relativ geringe Höhe von 0,74 nm besitzt.

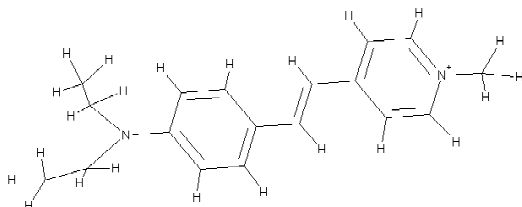


Abbildung 65: Strukturformel des Stilbenderivats.

Gelöst in Ethylenglykol liegt das Maximum im Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 66) bei 488 nm mit $\epsilon \sim 40000$ [Liter / mol cm]. Im Fluoreszenzspektrum liegt das Maximum bei etwa 630 nm. Während im Absorptionsspektrum eine

deutliche Blauverschiebung mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels beobachtet wird [Schwab2000] [Cao1998], ist das Fluoreszenzmaximum in Lösung relativ unverändert. Jedoch verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum in PMMA als Festkörpermatrix kurzweilig nach 550 nm. Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt in Ethylenglykol 10%. Adsorptionsversuche auf "fumed silica" zeigen, daß die Fluoreszenzquantenausbeute auf einer Silikatoberfläche auf $\sim 35\%$ ansteigt (siehe Kapitel 3.1.5).

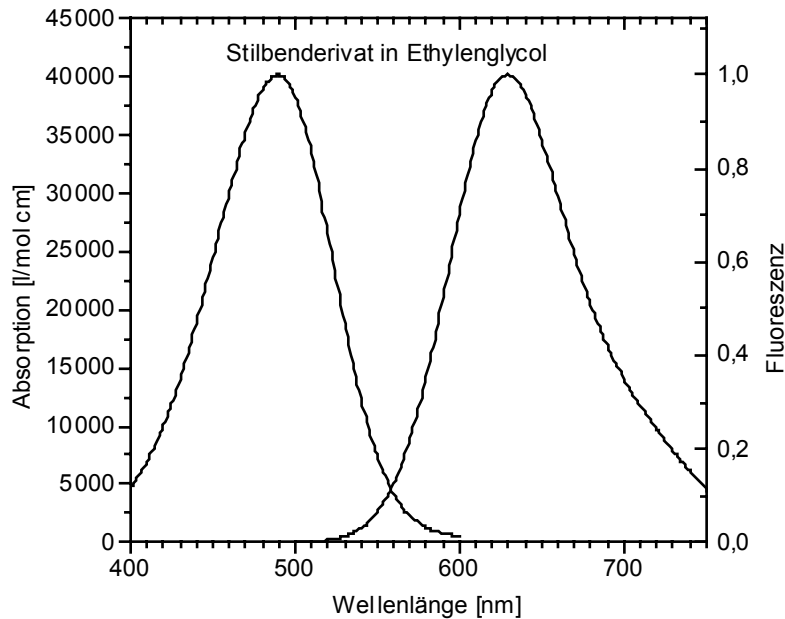


Abbildung 66: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Stilbenderivat in Ethylenglykol.

Vermutlich wird durch die Adsorption auf der Oberfläche die Beweglichkeit, die verantwortlich für die strahlungslose Deaktivierung des angeregten Zustandes ist, verringert. Durch eine höhere Konzentration aufgrund von Absorption an der Oberfläche steigt das Fluoreszenzsignal zusätzlich an. Die geringe und kurzweilige Absorption erschweren jedoch eine Einzelmoleküldetektion.

$\sigma(442 \text{ nm})$	$7,6 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2$
k_{rad}	$\sim 1 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$
k_{21}	$1 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ (1ns in Ethylenglykol)
Photozyklen	$4 \cdot 10^5$
Größe	0,5 nm 0,74 nm 1,5 nm

3.1.11 Zusammenfassung

Zusammenfassend werden für Untersuchungen an einzelnen Molekülen folgende Anforderungen gestellt:

- hohe Photostabilität
- möglichst langwellige Anregbarkeit
- hoher Absorptionsquerschnitt
- hohe Fluoreszenzquantenausbeute
- seltene und kurzlebige Auszustände

Diese Bedingungen erfüllt der Farbstoff TDI nahezu perfekt. TDI ist leider relativ groß und unpolar. Daher wird als kleines und polares Farbstoffmolekül Oxazin 1 ausgewählt. Mit den Oxazinen 170 und 750 sind dazu noch verschiedene Derivate vorhanden, die größere Abmessungen besitzen. Für eine kovalente Anbindung wird das in der Biochemie verbreitete Cy5 ausgewählt.

3.2 Porensysteme

In diesem Kapitel werden die porösen Festkörper, die in dieser Arbeit untersucht werden, vorgestellt. Da organische Farbstoffmoleküle in die Poren eingelagert werden sollen, sind nur relativ große Poren von Interesse. Kristalline Molekularsiebe mit definierten Atompositionen sind nur bis zu einem Porendurchmesser von etwas über 1 nm darstellbar, bei größeren Poren sind die Wände aus amorphem Material. Die kristallographisch wohldefinierten Poren werden als Mikroporen, die amorph aufgebauten als Mesoporen bezeichnet. Obwohl die Synthese der anorganischen Materialien von Kooperationspartnern durchgeführt wurde, soll hier kurz auf die wichtigsten Eigenschaften eingegangen werden. Wichtig für die Anwendung als Wirtsmatrix zur Einlagerung von Farbstoffen sind neben der Größe und der Dimensionalität der Poren auch die Polarität und elektrische Ladung des anorganischen Materials. Die durch die Wellenlänge des Lichtes limitierte Auflösung der optischen Mikroskopie erfordert Kristallabmessungen von einigen μm , um sicher im Inneren des Kristalls Messungen durchzuführen und Effekte, die durch die Oberfläche hervorgerufen werden, auszuschließen. Die Strukturdaten und Abkürzungen wurden dem 'Atlas of Zeolite structure types' [Zeolithatlas1996] und dessen Internetversion [ZeolithatlasNetz] entnommen.

Zeolithe besitzen Netzwerke aus $\text{SiO}_{4/2}$ -Tetradern, in denen durch teilweisen Ersatz der Zentralatome Ladungen in das Kristallgerüst eingebracht werden können. Der Ersatz eines Silizium Atoms durch ein Aluminium Atom erzeugt eine negative Ladung, die durch Gegenionen kompensiert werden muß. Diese Nichtgerüst-Kationen sind jedoch beweglich und können durch andere Kationen ausgetauscht werden. Dies ist die Grundlage der technisch weit verbreiteten Anwendung der Zeolithe als Ionenaustauscher z.B. als Wasserenthärtungsmittel in Waschmitteln. Viele organische Farbstoffmoleküle liegen als Kation vor und können auf diese Weise eine starke ionische Bindung an die Zeolithstruktur eingehen.

3.2.1 Faujasit

Vertreter dieser negativ geladenen Gerüststruktur sind die Faujasite wie Zeolith X und Zeolith Y. Dieser Wirt besitzt ein dreidimensional ausgedehntes Porensystem, bei dem etwa 1,3 nm große Hohlräume (supercages) durch 0,74 nm große Öffnungen miteinander verbunden sind. Siehe Abbildung 67.

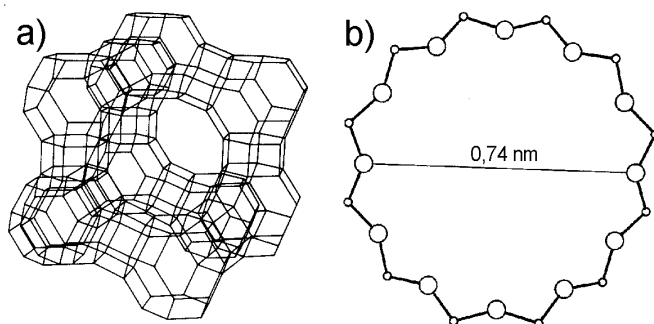


Abbildung 67: Aufbau der Porenstruktur von Faujasite, a) Dreidimensionale Käfigstruktur, b) Der Durchmesser der Verbindungsöffnungen beträgt 0,74 nm

Abhängig von der Anzahl der durch Aluminium ersetzten Silizium Atome unterscheidet man zwischen dealuminiertem Zeolith Y (DAY), ultra-stabilisiertem Zeolith Y (USY), Zeolith Y und Zeolith X.

Faujasittyp	Si:Al Verhältnis
dealuminiertem Zeolith Y (DAY)	∞ (Al frei)
ultra-stabilisiertem Zeolith Y (USY)	∞ bis 4
Zeolith Y	4 bis 2
Zeolith X	2 bis 1

Der dealuminierte Zeolith Y (DAY) sollte nicht als Porosil betrachtet werden, da das Aluminium erst nach der Synthese entfernt wird und dadurch sehr viele Mesoporen besitzt. NaX und NaY sind übliche Abkürzungen für Zeolith X und Zeolith Y, bei denen die negative Ladung des Gerüsts durch Na^+ Ionen ausgeglichen wurden. Trotz ihrer gleichen Struktur können sich die Eigenschaften von Zeolith Y und Zeolith X sehr unterscheiden. Durch spektrales Lochbrennen an mit dem Farbstoff Thionin beladenen Kristallen konnte nur im Zeolith Y ein Schalten des Farbstoffes beobachtet werden [Ehrl1994]. Zeolith Y ist gegenüber Zeolith X stabiler gegen den Abbau durch Säuren. Gewöhnlich synthetisierte Faujasit Kristalle sind aufgrund ihrer Größe von wenigen μm sehr klein und daher für lichtmikroskopische Untersuchungen ungeeignet. Spezielle Synthesen, die zu etwa 100 μm großen Kristallen führen, sind nur für den aluminiumreichen Zeolith X bekannt [Charnell1971] [Riemann1998]. Abbildung 68 zeigt einen dieser großen Kristalle, die als große reguläre Oktaeder aufwachsen.

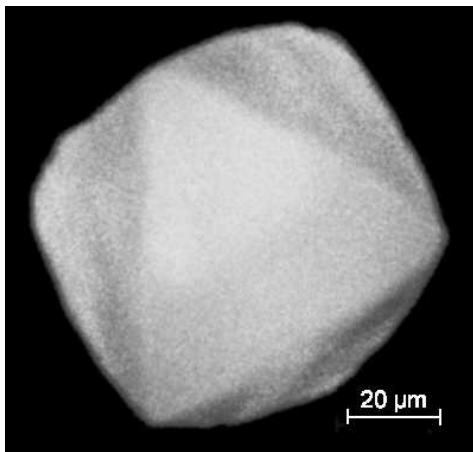


Abbildung 68: Dreidimensionale Projektion eines großen Zeolith X Kristalls. Das rekonstruierte Bild wurde durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes und invertieren der konfokalen Fluoreszenzbilder gewonnen.

3.2.2 Porosile

Porosile sind aus reinem SiO_2 aufgebaut und besitzen daher im Gegensatz zu den Zeolithen keine freien Ladungen. Dadurch sind nur van der Waals Wechselwirkungen mit den eingelagerten Gästen möglich, wodurch sie einen idealen Wirt für ungeladene aromatische Farbstoffe darstellen. Derzeit sind etwa 30 verschiedene Porosilstrukturen mit unterschiedlichen Durchmessern und Topologien der Poren bekannt [Zeolithatlas1996] [ZeolithatlasNetz] [Gies1992]. Zur Synthese werden

organische Moleküle oder Komplexe als Strukturdirektoren (Template) eingesetzt, die die Porenstruktur formen [Davis1992]. Zwei Porosile wurden in dieser Arbeit untersucht: Silikalit-1, das in der MFI Struktur (Zeolite Socony Mobil-five) kristallisiert, wurde gewählt, da hier sehr große Kristalle erhältlich sind; UTD-1, das in der Struktur DON (bzw. der ungeordneten Variante DONa) [ZeolithatlasNetz] kristallisiert, besitzt mit einem Porendurchmesser von 1,0 nm den größten bisher bekannten Kanal in einem Porosil. Abbildung 69 zeigt die Strukturen von MFI und UTD-1.

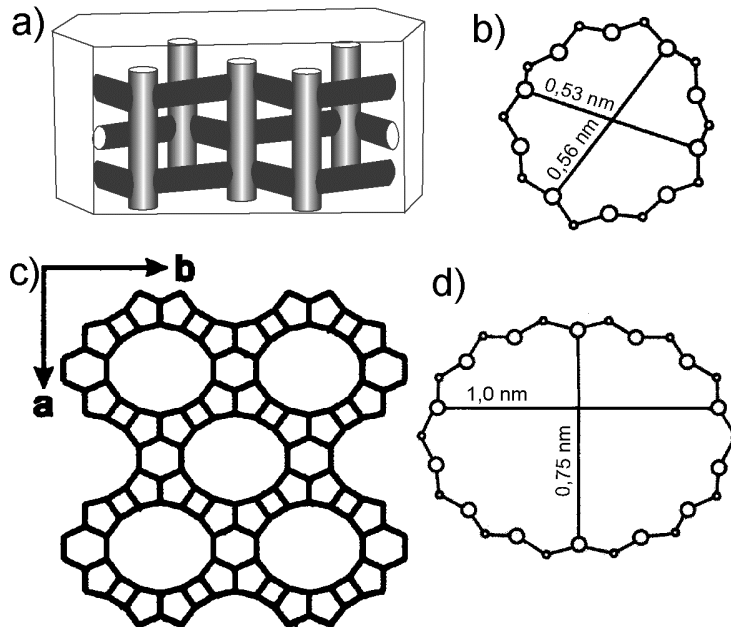


Abbildung 69: Strukturen der Porosile MFI und UTD-1. a) dreidimensionale Kanalstruktur in MFI, b) Durchmesser der geraden Kanäle in MFI, c) eindimensionale Kanalstruktur in UTD-1, d) Porendurchmesser in UTD-1.

MFI besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk aus geraden und zick-zack verlaufenden Poren. Aufgrund des maximalen Porendurchmessers von 0,56 nm bietet die MFI-Struktur aber nur sehr kleinen Farbstoffmolekülen Platz. Silicalite-1 wurde von R. Jäger [Jäger] nach einer Vorschrift von Guth et al. [Guth1986] mit Tetrapropylammoniumbromid als Templat synthetisiert. Die wässrige Synthese verläuft 14 Tage lang im Autoklaven bei 170°C. Solche Synthesebedingungen verhindern jedoch eine Zugabe von Farbstoff während der Synthese. Man erhält farblose, große 'sargdeckelförmige' Kristalle wie sie in Abbildung 70 abgebildet sind.

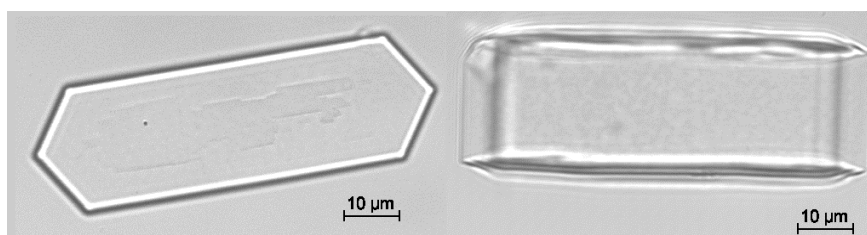


Abbildung 70: Seitenansichten des Silikalit-1; Typische Abmessungen sind 60 µm Länge, 20 µm Breite (links) und 5-20 µm Tiefe (rechts).

Verwachsungen, wie sie von Weidenthaler et al. [Weidenthaler1994] beschrieben wurden, konnten bei den untersuchten Kristallen nicht beobachtet werden. Zur Entfernung des Templats aus den Poren werden die Kristalle bei 600°C kalziniert (6 Stunden an Luft).

UTD-1 wird mit einem Bis(Pentamethylcyclopentadienyl)cobalt(III) hydroxide Komplex $[(Cp^*)_2Co]OH$ als strukturdirektierendes Templat synthetisiert. Zwei verschiedene Synthesen sind möglich: Eine Hydroxidsynthese [Lobo1997], bei der man kleine Nadeln erhält und eine Fluoridsynthese [Wessels1999], die zu großen Kristallnadeln führt. Abbildung 71 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der großen Kristallnadeln.

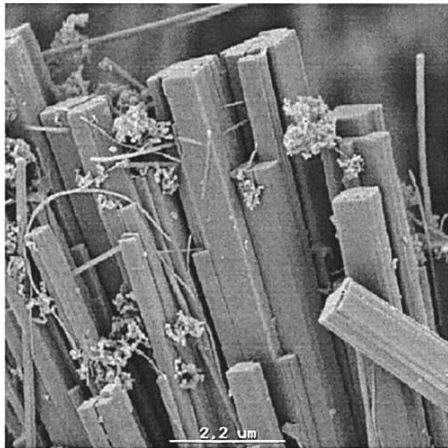


Abbildung 71: Elektronenmikroskopische Aufnahme von großen UTD-1 Kristallnadeln. Aus [Wessels1999].

Die Kristalle sind gelb, da der $[(Cp^*)_2Co]OH$ Komplex eine Absorption im nahen UV besitzt (siehe Spektrum in Abbildung 72).

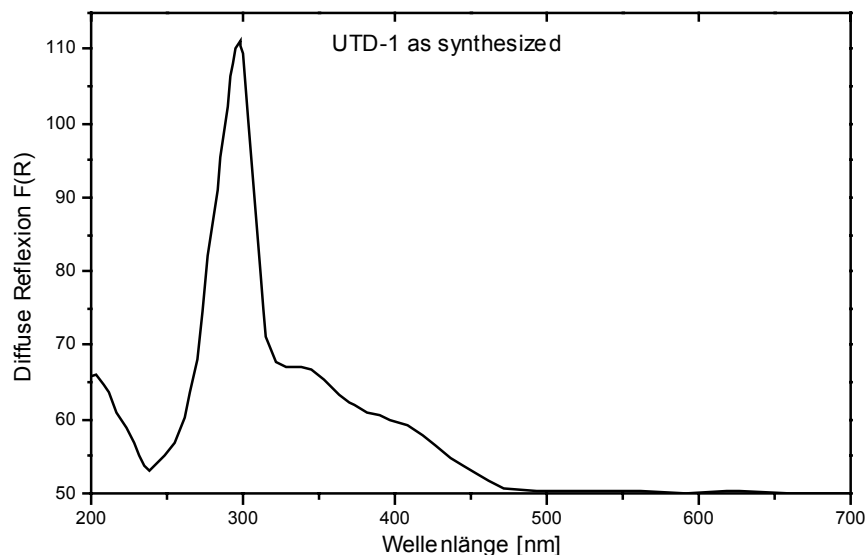


Abbildung 72: Diffuses Reflexionsspektrum von UTD-1 mit dem $[(Cp^*)_2Co]OH$ Templat [Jäger].

Die Entfernung des Co Komplexes ist leider problematisch. Beim ersten Schritt wird durch eine Kalzinierung an Luft bei 600°C der organische Anteil des Templats verbrannt, wobei vermutlich schwarzes Kobaltoxid in den Kanälen zurückbleibt. Im zweiten Schritt wird durch Extrahieren in verdünnter Salzsäure das Kobaltoxid aus den Poren herausgelöst. Der Extraktionsschritt verläuft bei den mit der Fluoridsynthese erhaltenen großen Kristallen nur sehr langsam, weshalb schwach grau gefärbte Kristalle zurückbleiben. Adsorptionsversuche zeigen auch, daß das innere Porenvolumen bei diesen Kristallen nicht vollständig zur Verfügung steht [Jäger2002]. In Abbildung 73 sind die stark unterschiedlichen Kristallgrößen der UTD-1 Kristalle aufgrund der verschiedenen Synthesemethoden dargestellt.

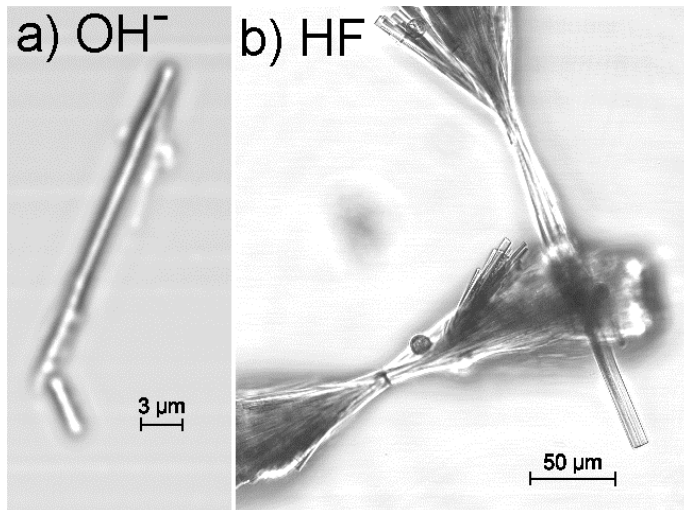


Abbildung 73: Je nach Synthesemethode kann man verschieden große UTD-1 Kristalle erhalten a) Hydroxymethode, b) Fluoridmethode.

3.2.3 $\text{AlPO}_4\text{-5}$

Ein sehr beliebtes Porensystem zum eindimensionalen Arrangieren von Gastmolekülen ist das Material $\text{AlPO}_4\text{-5}$ das in der AFI (**A**luminiumphosphate **five**) Struktur kristallisiert. Ersetzt man formal die $\text{SiO}_{4/2}$ -Tetradere im Porosil SSZ-24, das auch in der AFI Struktur kristallisiert, jeweils zur Hälfte gegen $\text{AlO}_{4/2}^-$ und $\text{PO}_{4/2}^+$, wird der nach außen ungeladene Festkörper $\text{AlPO}_4\text{-5}$ erhalten. Abbildung 74 zeigt die eindimensionale Porenstruktur mit ihren 0,73 nm großen Kanälen, die sich entlang der langen c-Achse des Kristalls erstrecken.

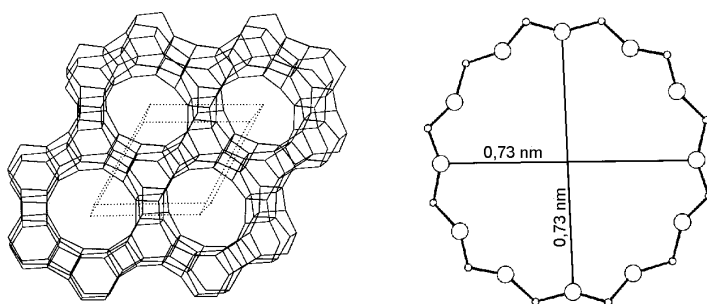


Abbildung 74: Eindimensionale Porenstruktur von $\text{AlPO}_4\text{-5}$.

Es sind verschiedene Synthesemöglichkeiten bekannt, die zu unterschiedlichen Kristallgrößen führen. Relativ kleine Kristalle mit verschiedenen während der Synthese eingelagerten Farbstoffen wurden von M. Ganschow in Bremen hergestellt. An diesen Kristallen ist die c-Achse, entlang der die Poren verlaufen, an den abgerundeten Kristallenden erkennbar. Durch einen Zusatz von HF entstehen sehr große $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle, die Millimeter lang werden können [Girnius1995]. Abbildung 75 zeigt eine Auswahl von verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle.

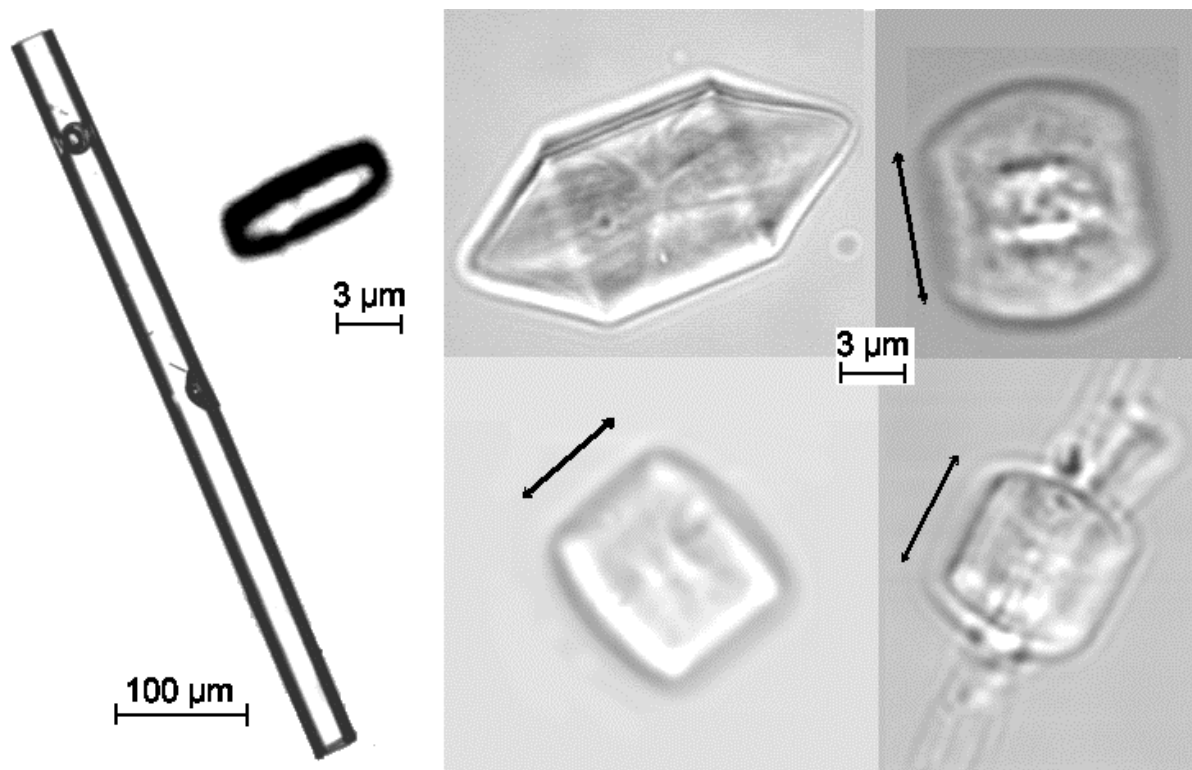


Abbildung 75: Kristallformen verschiedener $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle. In den unklaren Fällen zeigt ein Pfeil die c-Achse an, entlang der die Poren verlaufen.

Am Ende der Synthese sind die Poren mit dem als Templat dienenden Tripropylamin und etwa 15% Wasser gefüllt [Ikeda1999]. Geleerte Poren werden durch mehrstündiges Kalzinieren bei 600°C erhalten. Erst bei sehr hohen Beimischungen von Farbstoff wird das Kristallwachstum beeinflusst, wodurch ausgefranzte Kristalle entstehen. Dabei zeigte sich, daß Farbstoffe, die dem Templat ähneln (z.B. eine Aminofunktion besitzen), das Kristallwachstum nur sehr wenig stören [Hoppe1994].

Durch die Messung von Ablenkwinkeln eines Lichtstrahls konnten an $\text{AlPO}_4\text{-5}$ die Brechungsindizes entlang und quer zur Kristallachse bestimmt werden. [Striebel1997]. Abbildung 76 zeigt den wellenlängenabhängigen Brechungsindex von $\text{AlPO}_4\text{-5}$.

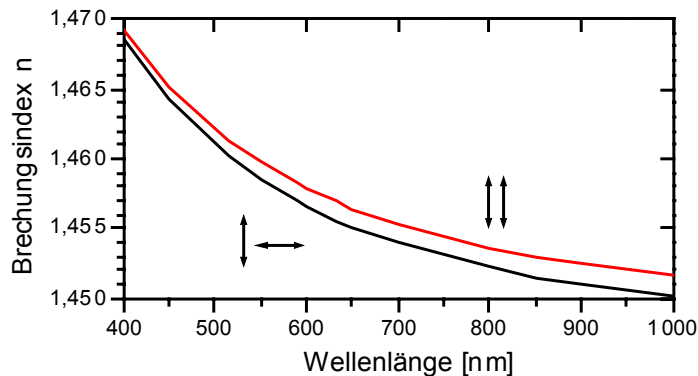


Abbildung 76: Polarisationsabhängiger Brechungsindex von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ [Striebel1997].

Aufgrund dieser Daten kann für rotes Licht eine Dicke von $\sim 240 \mu\text{m}$ berechnet werden, bei der eine $\lambda/2$ Verzögerung des parallel polarisierten Strahls auftritt. Sogar die sehr großen Kristalle besitzen nur einen Durchmesser von unter $50 \mu\text{m}$, so daß eine Verfälschung von gemessenen Polarisationswinkeln aufgrund der Doppelbrechung nicht berücksichtigt werden muß.

3.2.4 Mesoporöse M41S Materialien

Größere Porenradien können mit kristallinen Materialien nicht mehr erreicht werden. Die Atompositionen der Wände sind nicht mehr exakt definiert, wodurch amorphe Festkörper entstehen. Im Gegensatz zu den Sol-Gel-Materialien besitzen die M41S Materialien eine wohldefinierte Porentopologie und eine sehr schmale Porenradienverteilung. Zur Herstellung wird ein Tensid als Templat eingesetzt, das entweder schon alleine eine flüssigkristalline Phase bildet und die Porenstruktur vorgibt, oder die Strukturierung erfolgt in einem kooperativen Prozeß von Silikat und Tensid [Huo1994] [Firouzi1995] [Stucky1994]. Abbildung 77 zeigt schematisch den Herstellungsprozeß eines hexagonalen MCM-41 Porensystems durch eine vom Flüssigkristall vorgegebene hexagonale Packung von Tensidmicellen.

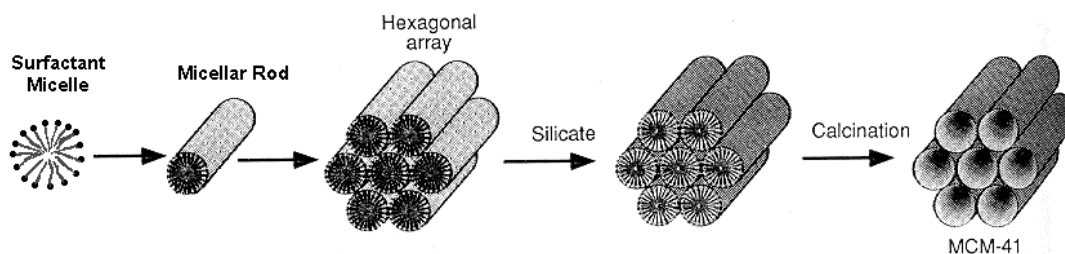


Abbildung 77: Herstellung des MCM-41 Porensystems nach dem Flüssigkristall-Mechanismus [Kresge1992].

Dadurch sind mesoporöse M41S Materialien mit einem Porendurchmesser von 2 nm bis über 10 nm darstellbar, wobei in dieser Arbeit nur Porengrößen von etwa 3 nm untersucht wurden. Die Poren sind durch amorphe Wände mit einer Dicke von etwa 1

nm (etwa 3 SiO₂ Atomlagen) getrennt. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen können direkt die Porenstruktur abbilden (siehe Abbildung 78).

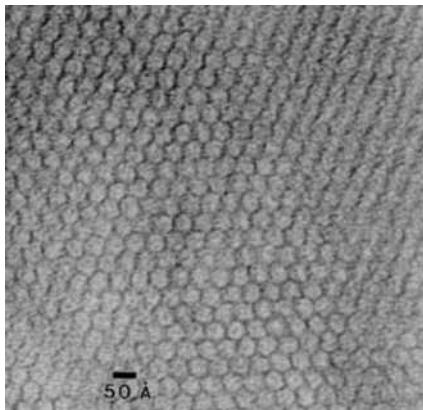


Abbildung 78: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines hexagonalen mesoporösen Oxids. Die dunklen Strukturen sind amorphe Wände aus SiO₂, die hellen Flecken sind offene Poren mit einem Durchmesser von etwa 4 nm (aus [Kresge1992]).

Durch geeignete Syntheseparameter sind verschiedene Porentopologien erreichbar. Abbildung 79 zeigt verschiedene Topologien und Dimensionalitäten von mesoporösen M41S Materialien.

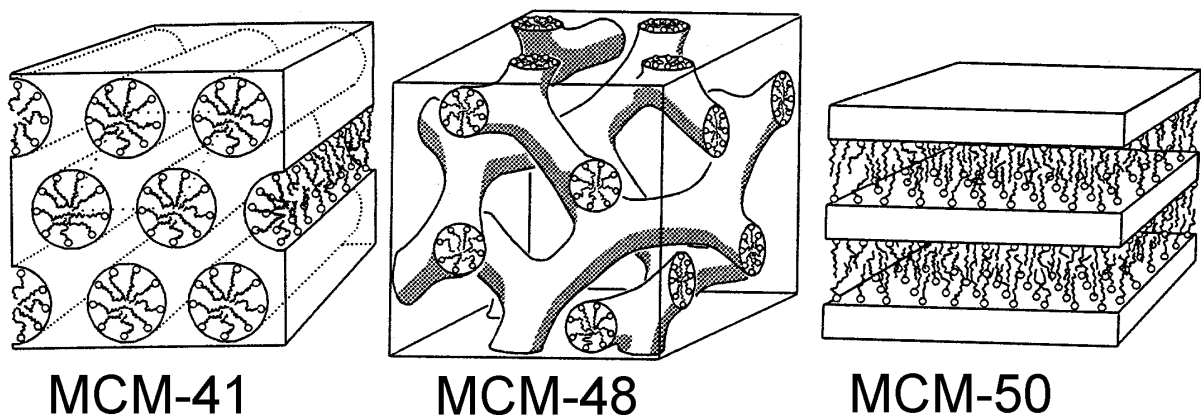


Abbildung 79: Kanaltopologien von verschiedenen mesoporösen Materialien: Eindimensionale hexagonal angeordnete Kanäle im MCM-41, zwei dreidimensionale unabhängige Kanalsysteme im MCM-48, zweidimensionale laminare Schichtstruktur im MCM-50.

Die Darstellung der mesoporösen M41S Materialien erfolgt über mehrere verschiedene Methoden. Bei der gewöhnlichen Hydrothermalsynthese wird das kationische Tensid (z.B. **Cetyltrimethylammoniumbromid** CTAB) mit einer Siliziumdioxid-Quelle, einer Base und Wasser vermischt und einige Stunden auf 100°C erhitzt [Ying1999]. Nach dieser Methode wurden von A. Glaue und S. Altmaier [Glaue] MCM-41 und MCM-48 Proben hergestellt, die etwa 1 µm große homogene Stücke enthalten. Die kubische oder hexagonale Packung der Poren wird mit Pulverröntgendiffraktogrammen bestimmt.

Zur Synthese von MCM-41 nach der Methode der homogenen Fällung wird eine homogene Silikatlösung mit dem Tensid hergestellt und die Fällung durch Zugabe von Essigsäureethylester gestartet. Erst nach mehrstündigem Altern wird die Reaktionslösung mehrere Tage auf 90°C erhitzt [Rathouseky1998]. Die MCM-41 Stücke, die von Y. Rohlfing [Rohlfing] nach dieser Methode erhalten wurden, haben eine sechseckige Form mit einer Breite von etwa 8 µm und einer Dicke von 4 µm (siehe Abbildung 82 b).

Lange M41S Fasern entstehen durch eine 2-Phasen-Synthese. Dabei wird eine angesäuerte, wässrige Tensidlösung (CTAB) mit einer flüssigen, organischen Siliziumquelle $(C_4H_9O)_4Si$ überschichtet. Nach mehreren Tagen wachsen Fasern nach unten in die wässrige Phase [Marlow2000]. Entgegen ersten Annahmen sind die Fasern nicht aus Poren entlang der Faserachse, sondern aus konzentrischen Ringen aufgebaut. Eine Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes der Faser zeigt deutlich die zirkuläre Porenstruktur der M41S-Faser (siehe Abbildung 80).

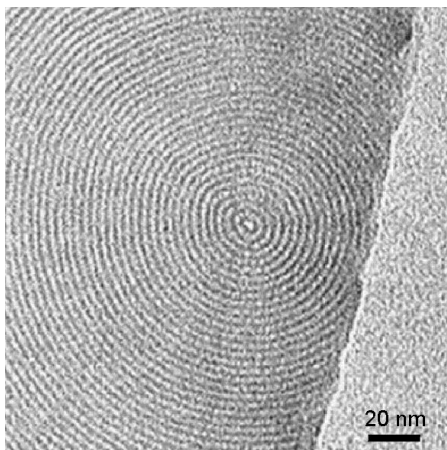


Abbildung 80: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes einer M41S-Faser (aus [Marlow2000]).

Sehr großes monolithisches M41S Material wird direkt aus einer flüssigkristallinen Phase des neutralen Tensids Octaethylglykolmonohexadecylether (OMO) mit gleicher Menge Wasser synthetisiert [Attard1995]. Das Phasendiagramm von OMO/Wasser (siehe Abbildung 81) weist bei Raumtemperatur eine normale hexagonale Phase H_1 auf.

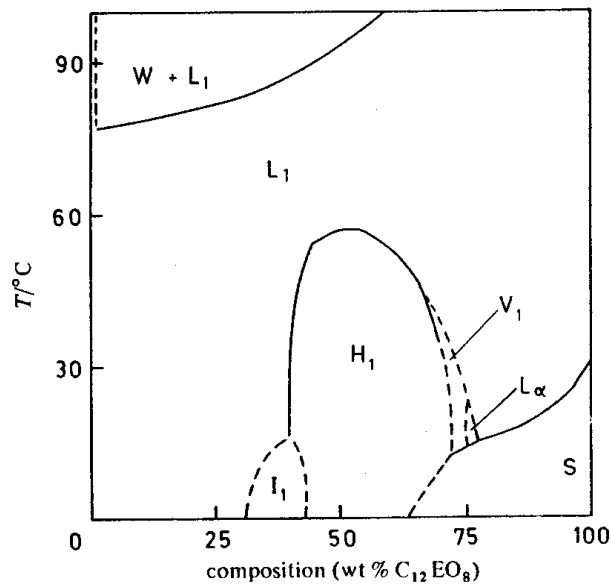


Abbildung 81: Phasendiagramm von OMO/Wasser (H₁: normal hexagonal, L_α: Lamellar, V₁: zweifach kubisch, L₁: flüssig, I₁: sphärische Mizellen, S: fest, W: monomer). Aus Mitchell et al. [Mitchell1983].

Durch vorsichtige Zugabe von Tetramethoxysilan ((CH₃O)₄Si, TMOS) und Kondensation im schwachen Vakuum kann die Struktur des Flüssigkristalls erhalten werden und es entstehen Zentimeter große, transparente Stücke. Die Porenradienverteilung (2,8 ± 0,4 nm) und hexagonale Ordnung ist in diesem monolithischem M41S Material jedoch nicht so gut wie bei den Synthesemethoden mit kationischen Tensid [Attard1995]. Mesostrukturierte M41S Monolithe nach dieser Flüssigkristallsynthese wurde von S. Altmaier hergestellt [Altmaier].

Einen Überblick über die mit den verschiedenen Synthesemethoden erhaltenen M41S Materialien zeigt Abbildung 82.

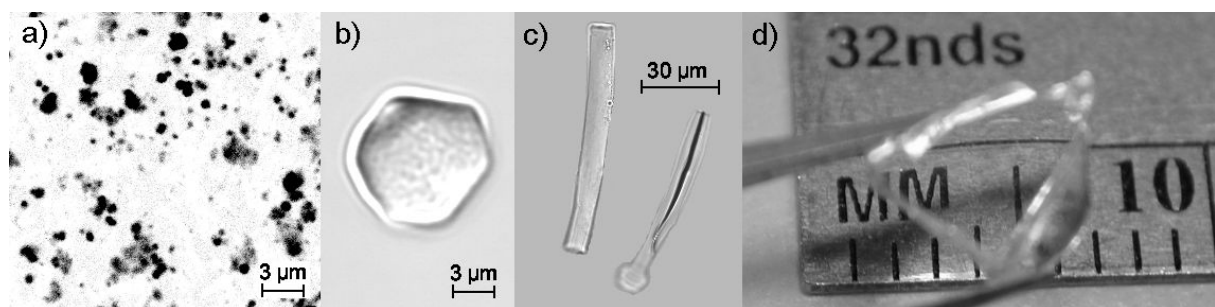


Abbildung 82: Verschiedene M41S Synthesen führen zu unterschiedlichen Materialien, a) Hydrothermalsynthese, b) homogene Fällung, c) Fasersynthese, d) Flüssigkristallsynthese.

3.2.5 Übersichtstabelle

Folgende Tabelle faßt die wichtigsten Eigenschaften der porösen Materialien zusammen.

Material	Porengröße / Dimension	Kristallgröße (Minimum)	Wandeigenschaften	Verwendbarkeit in dieser Arbeit
Zeolith Y	0.74 nm / 3 D	wenige μm	anionisch, polar	zu klein
Zeolith X	0.74 nm / 3 D	bis 60 μm	anionisch, polar	+
Silikalit-1	0.56 nm / 3 D	bis 20 μm (tief)	unpolar	viele Defekte
UTD-1	1.0 nm / 3 D	bis 15 μm (\emptyset)	unpolar	+
AlPO ₄ -5	0,73 nm / 1 D	bis 50 μm (\emptyset)	polar	+
MCM-41	~3 nm / 1D	bis 4 μm (dick)	OH Gruppen	+
MCM-48	~3 nm / 3D	< 1 μm	OH Gruppen	zu klein
M41S Faser	~3 nm / 1 D zirkular	bis 10 μm (\emptyset)	OH Gruppen	+
M41S Monolith	~2,8 nm / 1 D	einige mm	OH Gruppen	+

3.3 Einbau der Farbstoffe in die Poren

Der Einschluß von Farbstoffen in die Poren des Wirtsmaterials wird nach vier verschiedene Methoden durchgeführt. [Wöhrle1994] Es wird dabei unterschieden zwischen:

- 1) Kristallisationseinschluß, bei dem der Farbstoff während der Synthese der Porengerüsts zugegeben wird.
- 2) In situ-Synthese, bei der der Farbstoff innerhalb der Pore synthetisiert wird,
- 3) Eindiffusion von Farbstoff aus der Gas- oder Flüssigkeitsphase
- 4) Ionenaustausch, bei dem freie Ladungen der Wirtsmatrix durch eindiffundierende geladene Farbstoffmoleküle ausgeglichen werden.

Die Wahl einer geeigneten Methode wird von den physikalischen und chemischen Eigenschaften von Gast und Wirt bestimmt.

3.3.1 Kristallisationseinschluß

Bei dieser Methode wird das anorganische Gerüst während der Anwesenheit von Farbstoff hergestellt (siehe Abbildung 83). In der Regel kann mit dieser Methode fast jeder Farbstoff in den entstehenden Festkörper eingeschlossen werden. So konnten z.B. Rhodamin Farbstoffe, die um einiges größer sind als der Durchmesser einer AlPO₄-5 Pore in hohen Konzentrationen eingelagert werden, ohne das Kristallwachstum zu beeinflussen [Bockstette1998]. Die dabei entstehenden Mesoporen können aufgrund ihres seltenen und unregelmäßigen Vorkommens in Röntgenstrukturuntersuchungen nicht erkannt werden. Bei sehr hohen Konzentrationen kann der Farbstoff jedoch das Kristallwachstum beeinflussen oder sogar die Synthese einer anderen Struktur verursachen. Ein Problem der Einschlußsynthese stellen die oft drastischen Reaktionsbedingungen dar, bei denen die Gerüststrukturen synthetisiert werden. Besonders Synthesen im basischen Milieu

und Reaktionen bei hohen Temperaturen zerstören viele Farbstoffmoleküle. Durch den Einsatz von Mikrowellenöfen konnte aber die Reaktionsdauer einer $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Synthese um 1-2 Größenordnungen verringert werden, wodurch sich auch die instabilen Coumarin- und Azofarbstoffe einbauen ließen [Braun1997].

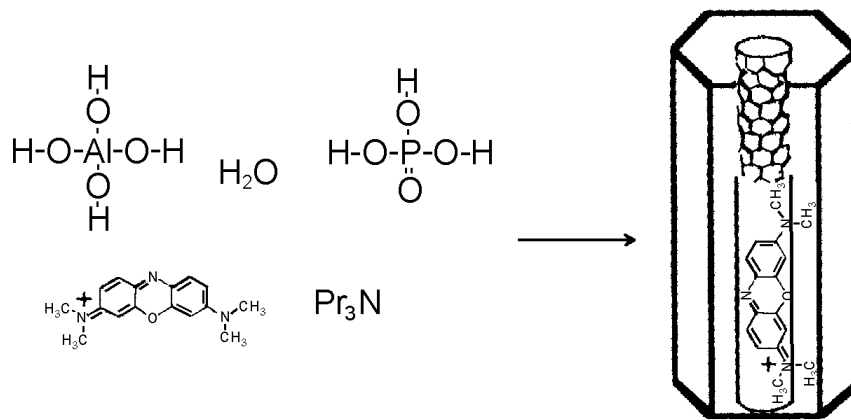


Abbildung 83: Schematische Darstellung des Kristallisationseinschlusses von Farbstoff während der Kristallsynthese.

Die mit den Oxazin Farbstoffen beladenen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle wurden von M. Ganschow auf diesem Syntheseweg hergestellt [Ganschow2001].

Auch der Einschluss von TDI in mesoporöse M41S Materialien wurde durch Lösen des Farbstoffes im Templat vor der Festkörpersynthese erreicht. Da TDI zudem extrem wasserunlöslich ist, kann erwartet werden, daß sich der Farbstoff nur innerhalb des hydrophoben Teils des Flüssigkristalls, im Inneren der Mizellen aufhält. Die mit TDI beladenen mesoporösen Monolithe hat S. Altmaier [Altmaier] auf diese Weise synthetisiert.

3.3.2 In situ-Synthese

Bei dieser Methode wird der Farbstoff in der fertigen Gerüststruktur synthetisiert. Die Edukte der Farbstoffsynthese werden nacheinander in die Wirtsstruktur eindiffundiert und dort zur Reaktion gebracht. Ist der gebildete Farbstoff größer als der Zugang zu der Pore ist dieser nicht mehr ohne Zerstörung des Gitters extrahierbar. In diesem Fall spricht man von einer "ship in the bottle" (Flaschenschiff) Synthese. Ein typisches Beispiel dieser Synthesemethode ist die Darstellung von Phthalocyanin Metallkomplexen in den Superkäfigen des Zeolith Y (siehe Abbildung 84) [Balkus1995].

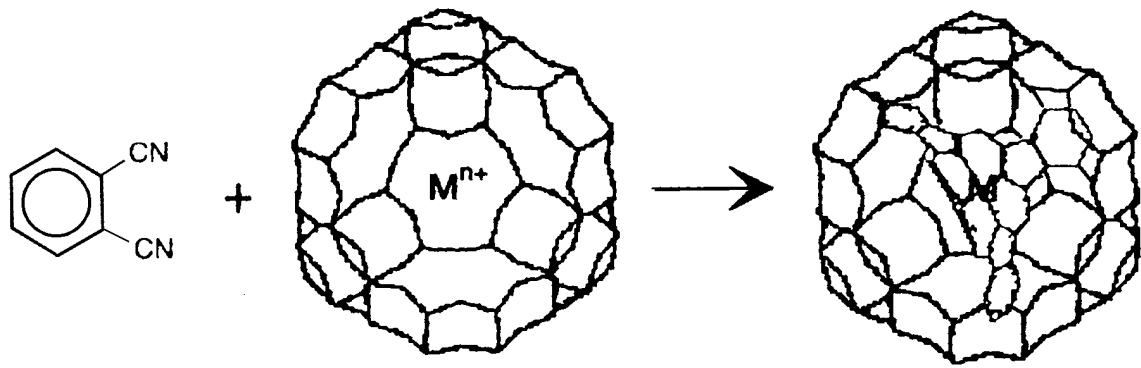


Abbildung 84: In situ-Synthese von Phthalocyanin im Superkäfig von Faujasit.

Neben Metallkomplexen wurden auch schon rein organische Farbstoffe wie Triphenylmethylum [Cona1996], Nil-Rot [Meinershagen1996], Methylorange und Azofarbstoffe [Schomburg1996] in einer Pore synthetisiert.

3.3.3 Diffusion

Die Beladung mit Farbstoff in das Porensystem aufgrund von Diffusion kann in der Gasphase und in Flüssigkeit erfolgen. Jedoch werden oft ungewöhnlich langsame Eindiffusionen gefunden, die durch stabile Adsorptionsplätze erklärt werden [Cozens1996]. Besonders aus der flüssigen Phase sind Beladungen mit den relativ großen Farbstoffmolekülen oft wenig erfolgreich, da das Lösungsmittel selbst die Pore füllt und dort anschließend nur schwer verdrängt werden kann [Deeg1992] [Brühwiler1998]. In diesem Fall kann die Wahl von sehr sperrigen Lösungsmitteln wie Triisopropylbenzol, das etwa 0,9 nm groß ist und daher nicht in kleine Pore eindiffundieren kann, eine Farbstoffbeladung ermöglichen. Alternativ kann eine Beladung auch über die Gasphase erfolgen. Eine Voraussetzung dafür ist jedoch, daß der Farbstoff sublimierbar ist, was in der Regel nur bei kleinen und ungeladenen Molekülen möglich ist. Vor einer Beladung durch Diffusion müssen die Poren von Templat und Wasser befreit werden, was durch Kalzinieren bei über 500°C erreicht wird. Abbildung 85 zeigt schematisch die Eindiffusion eines Farbstoffes in die Pore eines Molekularsiebes.

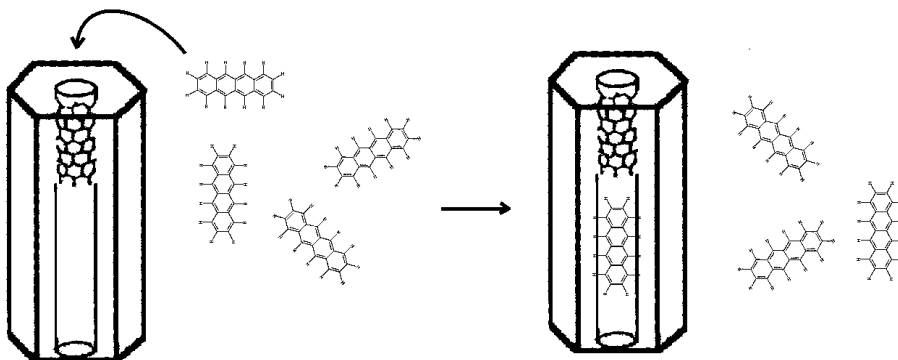


Abbildung 85: Schematische Darstellung der Beladung von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ mit Tetracen über Diffusion.

Mit dieser Methode hat R. Jäger [Jäger] die unpolaren Farbstoffe Tetracen und Pentacen im Vakuum in die Poren von Silikalit-1 und UTD1 eingelagert. Dazu wird der kalzinierte Molekularsieb mit dem Farbstoff in einem evakuierten Gasrohr mehrere Tage erhitzt, wodurch der Farbstoff sublimiert und sich in den Molekularsieb wieder abscheidet.

In sehr große Poren, wie z.B. in die des MCM-41, kann Farbstoff sehr gut aus einer Lösung eindiffundieren. Über eine kovalente Bindung an die Porenwand kann der Farbstoff in solch einer Mesopore sogar fixiert werden. Y. Rohlfing hat diese Methode verwendet, um den Farbstoff Cy5 kovalent an die, zuvor durch Silylierung mit einer Aminogruppe (mit 3-Aminopropyltriethoxysilan) derivatisierte, Porenwand anzubinden. Um zu verhindern, daß freie Aminogruppen an der äußeren Oberfläche der Kristalle entstehen, wurden zuvor die aktiven Gruppen der äußeren Oberfläche mit Diphenyldichlorsilan abgesättigt [Rohlfing].

3.3.4 Ionenaustausch

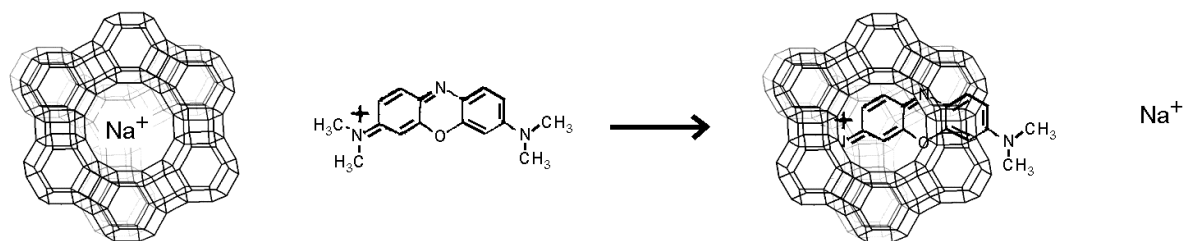


Abbildung 86: Schematische Darstellung der Einlagerung eines kationischen Farbstoffes in den Superkäfig von Zeolith A.

In Molekularsieben mit ionischem Gitter ist es möglich, die Gegenionen durch geladene Moleküle auszutauschen. Bei nicht zu großen Farbstoffmolekülen ist dieser Vorgang sehr effizient durchführbar. Das eingelagerte Farbstoffmolekül ist zwar ionisch an die Gerüststruktur gebunden, es kann aber durch andere Ionen leicht wieder verdrängt werden. Abbildung 86 zeigt schematisch die Einlagerung eines kationischen Farbstoffes in den anionischen Superkäfig des Zeolith A. Typische Beispiele für die Methode des Ionenaustausch sind die Beladung von Zeolith L und Y durch die Farbstoffe Thionin [Calzaferri1992] und Methyleneblau [Hoppe1993].

3.3.5 Tabelle aller vorhandenen Proben

Wirt	Gast	Labor-bezeichnung	Woher	Bemerkungen	Untersucht
AIPO ₄ -5	Stilbenderivat	A42	Panz / Behrens	rot, fluoresziert s.gut	Kapitel 4.1.4
AIPO ₄ -5	Azobenzol?	A43-A50	Panz / Behrens	fluoresziert	Kapitel 4.1.4
AIPO ₄ -11	Azobenzol?	A53	Panz / Behrens	ausgefranst an den Enden	unveröffentlicht
MCM-41	Zn Phthalocyanin	C6,C9,altmit	Wöhrle	mit TiO ₂	[Seebacher1997]
MCM-41	Zn Phthalocyanin	altohne	Wöhrle	ohne TiO ₂	[Seebacher1997]

MCM-41	Zn Phthalocyanin	L3	Wöhrle	erst calciniert. mit TiO ₂ und Farbstoff vermischt	[Seebacher1997]
MCM-41	Terrylen	M41T	Glaue / Behrens		[Mais2000]
MCM-48	Terrylen	M48T	Glaue / Behrens	HB möglich	[Mais2000]
MCM-50	Terrylen	M50T	Glaue / Behrens	fluoresziert gut	Mais2000], Ruppert
NaX	Thionin	NaXA,B,C	Jäger / Behrens	RT 2Wochen aus Lösung belegt, fluoresziert schlecht, E:Oberfläche gewaschen	Kapitel 3.2.1
NaX	Thionin	NaXD	Jäger / Behrens	bei 60°, 1Woche aus Lösung belegt, erst blau dann violett.	unveröffentlicht
MFI	Pentacen	P	Jäger / Behrens	gemörsert; 300° belegt, PE:Extrahiert	Kapitel 4.7.1
MFI	Pentacen	P1	Jäger / Behrens	bei 400° Gasphasenbelegung	Kapitel 4.7.1
MCM-41	Tetrahydroxyteraphenylporphin	TP	Glaue / Behrens	Lochbrennen OK, Ionisch durch Deprotonierung	[Seebacher1997]
UTD-1	Pentacen	Utd1P	Jäger / Behrens	unter Ar Schutzgas	Kapitel 4.7.1
Monolith	Terrylen diimid	M11-13,16-17	Altmaier / Behrens	Scherben	z.B. Kapitel 4.3.2.3
UTD-1	Leer	Utd1-4	Jäger / Behrens	mit Co-Complex	Kapitel 3.2.2
UTD-1	Tetracen	Utd1-Tetracen-1	Jäger / Behrens	Tetracen noch OK?	Kapitel 4.7.1
UTD-1F	Leer	Utd1-23c	Jäger / Behrens	F- Synthese, groß, HCl gewaschen aber noch grau	Kapitel 4.3.2.4
UTD-1	Leer	UTD1OH	Jäger / Behrens	OH- Synthese, kleine Nadeln	Kapitel 3.2.2
MFI	Leer	Mfi-3	Jäger / Behrens	as syntesized	Kapitel 4.1.2
MFI	Pentacen	Mfi-P	Jäger / Behrens	bei 300°C, gemörsert	Kapitel 4.7.1
MFI	Pentacen	Mfi-P1	Jäger / Behrens	bei 400°C	Kapitel 4.7.1
AIPO ₄ -5	Leer	AIPO4-5klein	Panz / Behrens	calciniert	Kapitel 3.2.3
AIPO ₄ -5	Leer	AIPO4-5big	Weiss / Schüth	nicht calciniert, groß	Kapitel 4.1.4
AIPO ₄ -5	DCM	AIPO4-5DCM	Weiss / Schüth	groß	Kapitel 4.1.4
MCM-41	Terrylen diimid	SA902-908	Altmaier / Behrens	0 bis 10 ⁻⁸ molar	unveröffentlicht, Ruppert

MCM-48	Terrylen diimid	SA909-915	Altmaier / Behrens	0 bis 10^{-8} molar	unveröffentlicht, Ruppert
MCM-41	Terrylen	SA916-922	Altmaier / Behrens	0 bis 10^{-8} molar	Ruppert
MCM-48	Terrylen	SA923-929	Altmaier / Behrens	0 bis 10^{-8} molar	Ruppert
MCM-41	Terrylen diimid	SA977	Altmaier / Behrens	10^{-5} molar	unveröffentlicht, Ruppert
MCMFaser	Rhodamin 6G	MLW010, 080, 640	Marlow	0,2%; 0,02%, 0,002%	Kapitel 4.2.3
MCMFaser B	Leer	PLX-A	Findenegg	claciniert 0,7nm Poren 2x16 μ m	unveröffentlicht
MCMFaser	Leer	PLX-G	Findenegg	calciniert 1,2 nm Poren 3x80 μ m	unveröffentlicht
MCM-41	Leer	BGX16A	Findenegg	als Referenz	
MCM-41	Cy5	Sil1-4	Rohlfing / Wöhrle	10^{-6} - 10^{-12} mol/g	z.B. Kapitel 4.3.2.2
MCM-41	Cy5	Presil1-4	Rohlfing / Wöhrle	Oberfläche Silanisiert	z.B. Kapitel 4.3.2.2
UTD-1	Tetracen	Utd1-Tetracen2	Jäger / Behrens	fl-Spektrum Breit, viel	Kapitel 4.7.1
UTD-1	Tetracen	Utd1-Tetracen3	Jäger / Behrens	aus: UTD1-46ND	Kapitel 4.7.1
NaX	Mischung	7663	Ganschow / Wöhrle	3Farbstoffe: Cumarin Rhodamin Oxazin	unveröffentlicht
AIPO ₄ -5	Oxazin 1	Ox1-4 -13	Ganschow / Wöhrle	10^{-4} bis 10^{-13} mmol/g	z.B. Kapitel 4.6.5
AIPO ₄ -5	Oxazin 170	Ox170-4 -13	Ganschow / Wöhrle	10^{-4} bis 10^{-13} mmol/g	z.B. Kapitel 4.6.5
AIPO ₄ -5	Oxazin 750	Ox750-4 -13	Ganschow / Wöhrle	10^{-4} bis 10^{-13} mmol/g	z.B. Kapitel 4.6.5

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzbilder mit vielen Farbstoffmolekülen (Ensemble)

Die konfokale Betriebsart des Mikroskops erlaubt es, die Farbstoffverteilung anhand des Fluoreszenzsignals mit hoher räumlicher Auflösung zu bestimmen. Bei vielen Proben ist der Farbstoff nicht gleichmäßig in den Kristallen verteilt, sondern vielmehr ist oft eine starke Heterogenität der Farbstoffkonzentrationen vorhanden. Solche Heterogenitäten sind mit vielen Farbstoffmolekülen viel einfacher zu untersuchen, da bei einer Probe mit einzeln verteilten Farbstoffmolekülen über die Stellen, an denen gerade kein Molekül sitzt, auch keine Aussage gemacht werden kann.

4.1.1 Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$

Die Diffusion von Farbstoffen aus einer Lösung in einen porösen Festkörper stellt eine Möglichkeit dar, die Poren mit Farbstoff zu füllen. Dazu wurde versucht, das Eindringen des Farbstoffes in einen Kristall zu beobachten. Für eine erste Untersuchung wurde ein großer Aluminiumphosphatkristall ($\text{AlPO}_4\text{-5}$) [Weiss], der noch das Triisopropylamintemplat der Synthese in den Poren enthält, mit einer 10^{-5} molar in Ethylenglykol gelösten Oxazin 1 Farbstofflösung versetzt. Das Transmissionsbild (Abbildung 87 a) zeigt einen 0,3 mm großen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall, der in der Mitte und im unteren Bereich ein paar Absplitterungen aufweist.

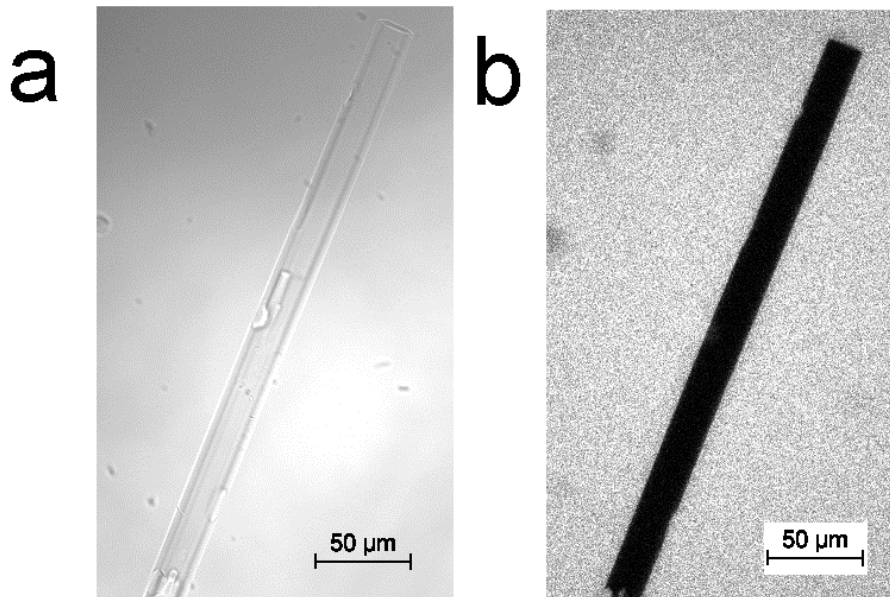


Abbildung 87: Kein Eindringen von Oxazin 1 Farbstoff in einen nicht kalzinierten $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall. a) Transmissionsbild, b) konfokales Fluoreszenzbild.

Der Kontrast in dem Bild entsteht durch den kleinen, aber nicht verschwindenden, Brechungsindexunterschied zwischen dem Kristall und der Ethylenglykolumgebung. Das konfokale Fluoreszenzbild (Abbildung 87 b), bei dem die Fokalebene genau in die Mitte zwischen Unter- und Oberseite gelegt wurde, zeigt, daß innerhalb des Kristalls keine Fluoreszenz auftritt. Auch an der Oberfläche ist keine erhöhte

Fluoreszenz durch eventuelle Adsorption erkennbar. Auch ein nochmaliger Test nach mehreren Tagen zeigte keine Spuren von Farbstoff im Inneren des Kristalls.

Anders ist der Befund bei einem Kristall, dessen Porenhalt vor dem Versuch geleert wurde. Dazu wurde die Probe an Luft bei 600°C kalziniert, wobei das organische Templat vollständig verbrennt. (Bei 500°C ist die Kalzinierung nur unvollständig wodurch braune Kristalle entstehen). Diesmal wurden die Kristalle für 3 Monate in die 10^{-5} molare Oxazin 1 Lösung in Ethylenglykol gegeben und anschließend mehrmals mit Ethanol gewaschen. Einen typischen Kristall zeigt Abbildung 88.

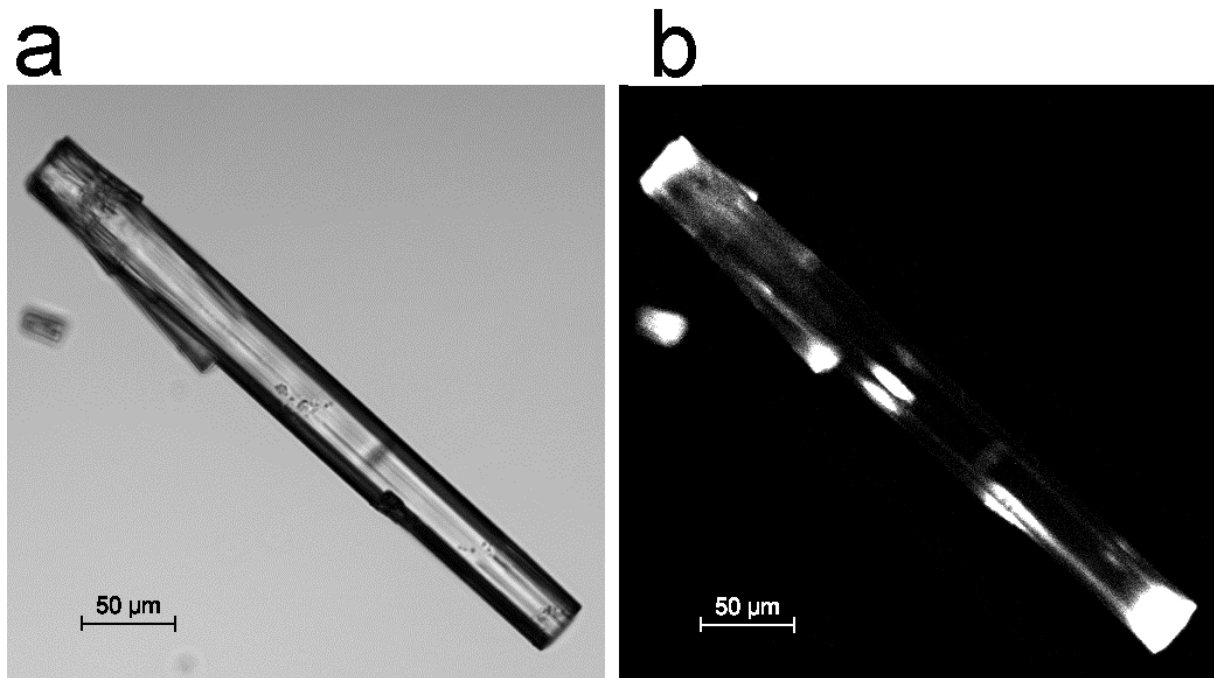


Abbildung 88: Geringes Eindringen von Oxazin-1 Farbstoff in einen kalzinierten AlPO₄-5 Kristall. a) Transmissionsbild, b) konfokales Fluoreszenzbild.

Das Transmissionsbild links zeigt, daß die Morphologie der Kristalle durch das Kalzinieren unverändert ist und die Anzahl der erkennbaren Defekte nur geringfügig zugenommen hat. Das entsprechende Fluoreszenzbild rechts zeigt, daß diesmal Farbstoff in das Innere des Kristalls diffundiert ist. Die Eindringstellen liegen an den Enden des Kristalls, wo auch die eindimensionale Poren enden und an mehreren Stellen in der Mitte des Kristalls, wo vermutlich kleine Risse in das Kristallinnere entstanden sind. Etwa 10 µm ist der Farbstoff dann von den von außen zugänglichen Stellen in der eindimensionalen Porenstruktur entlangdiffundiert. Die aufgenommenen konfokalen Fluoreszenzbilder können aber keine Aussage darüber machen, ob alle Kanäle durch die Kalzinierung geöffnet wurden. Adsorptionsuntersuchungen von Ö. Weiss zeigen ein verringertes Porenvolumen [Weiss]. Schon einige offene Kanäle im Abstand unterhalb der optischen Auflösung, in denen der Farbstoff in das Innere gelangen kann, würden ausreichen, um ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal zu erzeugen.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß das Triisopropylamintemplat sehr stark in den Röhren des AlPO₄-5 gebunden ist und daher nicht einfach herausgelöst werden kann. Ist das Templat durch Kalzinieren entfernt worden, kann der Farbstoff Oxazin 1, trotz der etwas größeren Breite von 0,87 nm gegenüber dem

Porendurchmesser von 0,73 nm, sehr langsam in die leeren Poren eindiffundieren. Dies ist durch Fluktuationen der Molekülgröße und evtl. auch des Porendurchmessers möglich.

4.1.2 Mesoporen in kalziniertem Silikalit-1

Die Möglichkeit Fehlstellen in Kristallen anzufärben und dadurch sichtbar zu machen soll nun mit einer weiteren Probe demonstriert werden.

Von dem Porosil Silikalit-1 (MFI-Struktur aus reinem SiO_2) sind durch eine spezielle Synthese sehr große Kristalle erhältlich. Die sargdeckelförmigen Silikalit-1 Kristalle von scheinbar perfekter Morphologie zeigen im Transmissionsbild in Abbildung 89 nur geringe Defekte auf der Oberfläche.

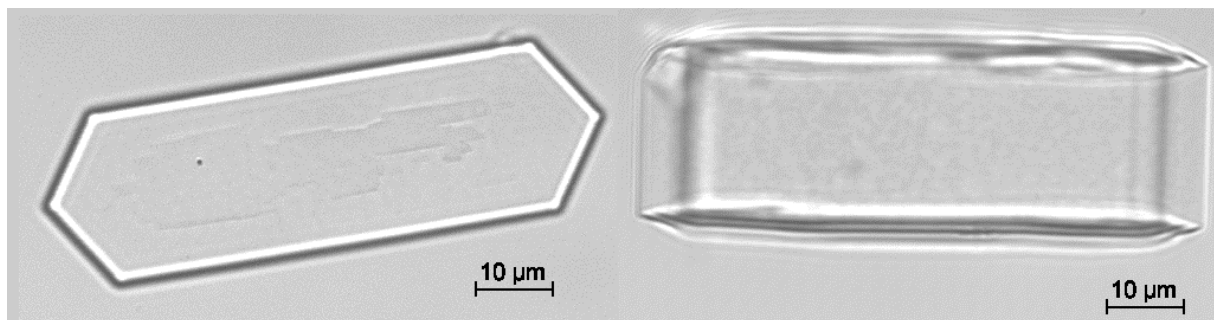


Abbildung 89: Transmissionsbild von zwei nicht kalzinierten Silikalit-1 Kristallen: Das linke Bild zeigt die sargdeckelförmigen Umrisse eines Kristalls, der an der Oberfläche geringe Defekte aufweist, das rechte Bild zeigt den Querschnitt in einem um 90° gedrehten Kristall. Die sargdeckelförmige Seite der Kristalle (links) besitzt in etwa immer dieselben Abmessungen, hingegen ist die Dicke der Kristalle zwischen 5 und $25\mu\text{m}$ sehr verschieden.

Bei der Kalzinierung der Kristalle bei 600°C an Luft werden diese Defekte verstärkt, sind aber aufgrund der geringen Tiefenschärfe im Transmissionsbild nicht dreidimensional lokalisierbar (siehe Abbildung 90).

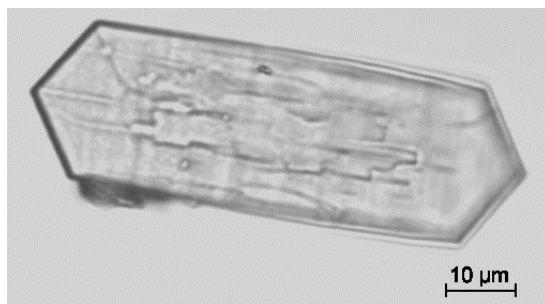


Abbildung 90: Das Transmissionsbild eines kalzinierten Silikalit-1 Kristalls zeigt eine erhöhte Anzahl von Defekten.

Auch die Variation der Aufheizrate bei der Kalzinierung, zwischen wenigen Stunden und einer Woche, hat keinen sichtbaren Einfluß auf die Bildung der Defektstrukturen. Anschließend wurde durch die Zugabe einer 10^{-5} molaren Oxazin 1 Lösung in Ethylenglykol der Kristall mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt. Zu beachten ist die

Tatsache, daß die Höhe des Oxazin 1 Moleküls mit 0,87 nm einiges größer ist als der größte Durchmesser der Silikalit-1 Poren mit 0,56 nm. Etwa gleichzeitig mit dem Erreichen des Kristalls nach dem Zutropfen der Farbstofflösung ist auch schon im Inneren des Kristalls Fluoreszenz sichtbar. Das Eindringen des Farbstoffes ist also etwa genauso schnell wie die freie Diffusion im Lösungsmittel Ethylenglykol. Der Oxazinfarbstoff wird jedoch nicht homogen, sondern in einem länglichen Band entlang des Kristalls in den kalzinierten Silikalit-1 aufgenommen. Abbildung 91 a) zeigt einen konfokalen Schnitt durch einen auf der Seite liegenden Kristall.

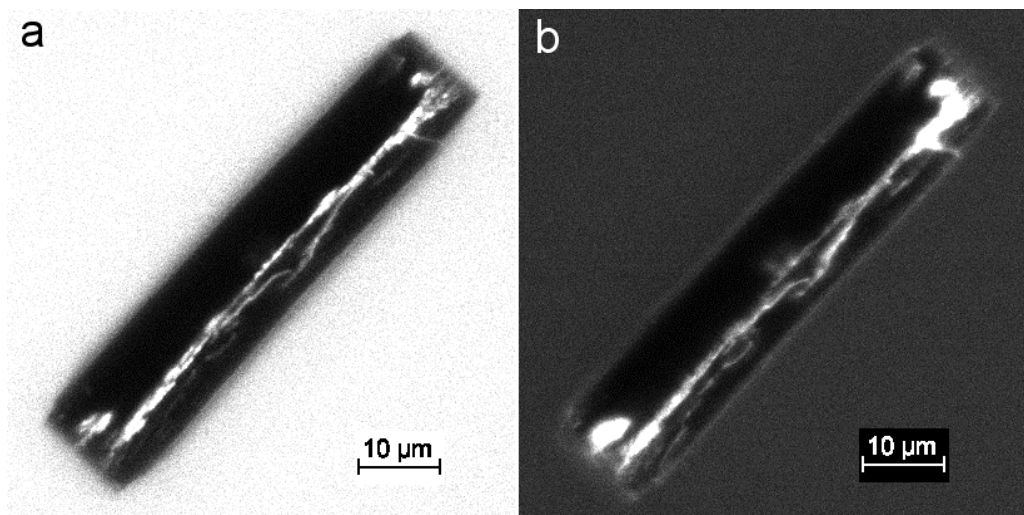


Abbildung 91: Konfokales Fluoreszenzbild eines kalzinierten Silikalit-1 Kristalls nach der Zugabe einer a) Oxazin 1 Lösung b) Stilbenderivat Lösung. Die Bilder wurden in einer Tiefe von 11 µm in dem etwa 20 µm breiten Kristall aufgenommen.

Die Anwendung eines speziellen Stilbenfarbstoffes anstelle des Oxazin 1 führt zu einem Bild (Abbildung 91 b), in dem die freie Lösung nicht so stark fluoresziert. Der Effekt beruht überwiegend darauf, daß das Stilbenderivat adsorbiert auf einer Oberfläche eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute besitzt als in Lösung (siehe Kapitel 3.1.10.6). Dadurch wird nur noch die innere Struktur des angefärbten Kristalls sichtbar. Beide Farbstoffe sind durch geeignete Auswahl von Anregungs- und Detektionswellenlänge sogar gleichzeitig anwendbar. Bei einer Anregung mit blauem Licht bei 442 nm wird nahezu nur der Stilbenfarbstoff angeregt, während bei einer Anregung mit rotem Licht bei 632 nm nur das Oxazin 1 adressiert wird [Schwab2000]. Das Fluoreszenzsignal des Stilbenderivats markiert Risse und große Poren und andere große Oberflächen, das Signal des Oxazin 1 zeigt dieselben Strukturen im Inneren des Kristalls, jedoch zusätzlich die äußere Lösung.

Mit dem konfokalen Mikroskop ist es nun auch möglich, die Verteilung der Farbstoffe dreidimensional zu detektieren und so ein dreidimensionales Bild des Kristalls und dessen Defektstruktur aufzunehmen. Die dreidimensionale Darstellung in flacher oder druckbarer Form ist jedoch nur eingeschränkt möglich. Mit der Software des Mikroskops kann z.B. aus beliebigen Blickwinkeln eine Projektion berechnet werden. Am Eindruckvollsten ist die Darstellung als Film, bei dem von Bild zu Bild der Betrachtungswinkel in eine Richtung weiter gedreht wird, worin ein Betrachter sehr leicht einen sich drehenden dreidimensionalen Körper erkennt. Für die gedruckte Form bleiben nur komplizierte Stereobilder oder ausgewählte Projektionen.

Abbildung 92 zeigt eine ausgewählte Projektion der dreidimensionalen Verteilung der angefärbten Defektstruktur des Silikalit-1 Kristalls.

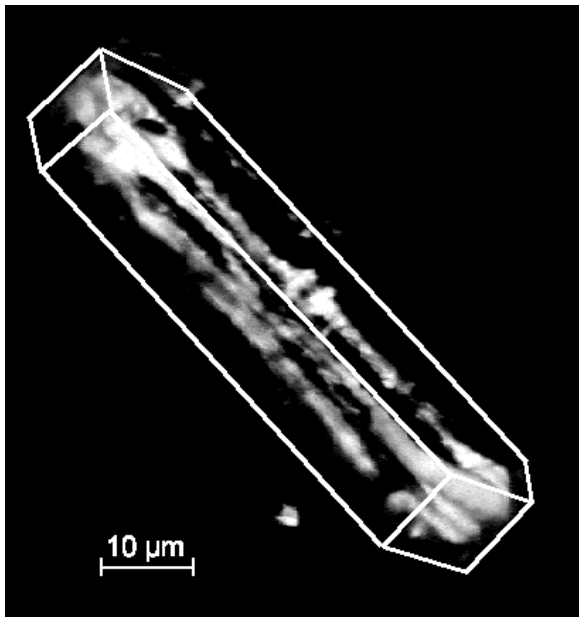


Abbildung 92: Die Projektion der dreidimensionalen Verteilung des Stilbenderivats zeigt die angefärbte Defektstruktur im kalzinierten Silikalit-1, die Kanten des Kristalls wurden nachträglich mit weißen Linien eingezeichnet.

Die Defektstruktur, die an den spitzen Enden des Kristalls am ausgeprägtesten ist, erstreckt sich in drei parallelen Kanälen entlang des Kristalls. Eine Vergleichsmessung mit einem nicht kalzinierten Silikalit-1 Kristall zeigt, daß die Defekte erst durch das Erhitzen entstehen.

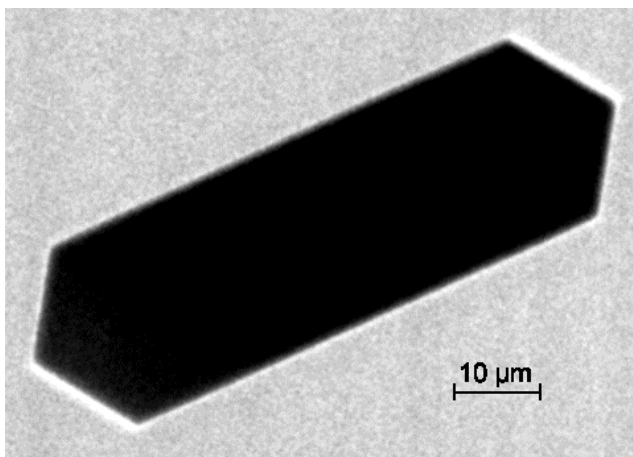


Abbildung 93: Keine anfärbbare Defektstruktur in einem nicht kalzinierten Silikalit-1 Kristall.

Abbildung 93 zeigt, daß nach dem Zugeben des Stilbenfarbstoffes kein Farbstoff im Inneren des Kristalls detektiert werden kann. Nur die Oberfläche des Kristalls zeigt aufgrund der erhöhten Quantenausbeute von adsorbierten Molekülen eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität. Daß diesmal auch Fluoreszenz in der freien Lösung

detektiert wird, liegt an der hier etwa 100 mal höher eingestellten Verstärkung des Fluoreszenzdetektors.

Zusammenfassend wurde eine Methode entwickelt, mit der die Defektstruktur von Kristallen nach dem Anfärben mit geeigneten Farbstoffen durch die konfokale Mikroskopie dreidimensional charakterisiert werden kann.

4.1.3 NaX

Allein die passende Geometrie eines Farbstoffes ist keine Garantie dafür, daß eine Eindiffusion in einen porösen Festkörper möglich ist. Oft ist der Verdrängungsprozeß des Lösungsmittels der entscheidende Faktor. So ist der Farbstoff Thionin klein genug (0,74 nm), um durch die Verbindungskanäle eines NaX Kristalls (0,74 nm) durch den Festkörper zu wandern. Und es konnte auch schon durch Diffusion Thionin in den sich nur durch seine Kationenzahl unterscheidenden NaY eingebracht werden [Ehrl1994].

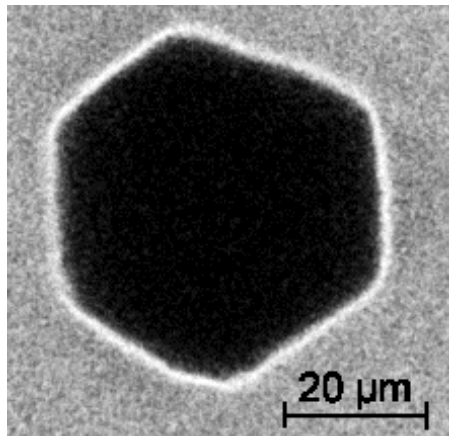


Abbildung 94: Anfärbeversuch eines großen NaX-Kristalls mit Tetracen.

Durch eine spezielle Synthese [Charnell1971] [Riemann1998] sind nun auch bis zu 100 µm große NaX Kristalle erhältlich, mit denen dreidimensionale optische Untersuchungen möglich werden. Eine Kalzinierung bei 600°C überstehen die oktaederförmigen Kristalle ohne sichtbare Veränderung. Jedoch ist auch unter drastischen Bedingungen (2 Wochen bei 60°C in Ethanol) keine Eindiffusion des Farbstoffes in diese großen NaX Kristalle gefunden worden. Untersuchungen mit den ungeladenen und relativ kleinen Farbstoff Tetracen (0,74 nm) zeigen nach 3 Tagen ein erhöhtes Fluoreszenzsignal an der Oberfläche eines großen NaX-Kristalls.

Siehe Abbildung 94. In dem konfokalen Fluoreszenzbild kann aber nicht zwischen einer Adsorption an der Oberfläche oder einer geringen Eindiffusion (maximal 300 nm) unterschieden werden.

4.1.4 ALPO₄-5

Eine Methode, die fast immer zum Einschluß von Farbstoffmolekülen in eine Probe führt, ist die Zugabe des Farbstoffs zur Synthese des Kristalls (siehe Kapitel 3.3). Überschreiten jedoch die Abmessungen des Farbstoffes den Durchmesser der Poren erheblich, kann davon ausgegangen werden, daß sich der Farbstoff durch die Erzeugung eines lokalen Defekts mehr Platz in der Pore verschafft. Meist reagiert das Kristallwachstum recht unempfindlich auf solche lokalen Defekte und erst bei sehr hohen Konzentrationen des unpassenden Farbstoffes treten sichtbare Änderungen in der Morphologie des Kristalls auf [Braun2000]. Bislang unbekannt ist, wie gleichmäßig ein Farbstoff bei derartigen Synthesen in den Wirtskristall eingebaut wird.

Eine spezielle Synthesemethode von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ wurde von A. Glaue entwickelt [Glaue1999]. Dabei werden die Edukte in etwa 200°C heißes Ethylenglykol geschüttet, wodurch $5\ \mu\text{m}$ kleine $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle erhalten werden. Wird in dem Ethylenglykol zuvor der Stilbenderivatfarbstoff (siehe Kapitel 3.1.10.6) gelöst, wird dieser auch in den Kristall mit eingebaut und man erhält ein schwach rosa gefärbtes Pulver. Die Höhe des Farbstoffes paßt mit $0,74\ \text{nm}$ sehr gut in den Porendurchmesser von $0,73\ \text{nm}$. Abbildung 95 a zeigt das Transmissionsbild zweier in dieser Synthese erhaltenen Kristalle.

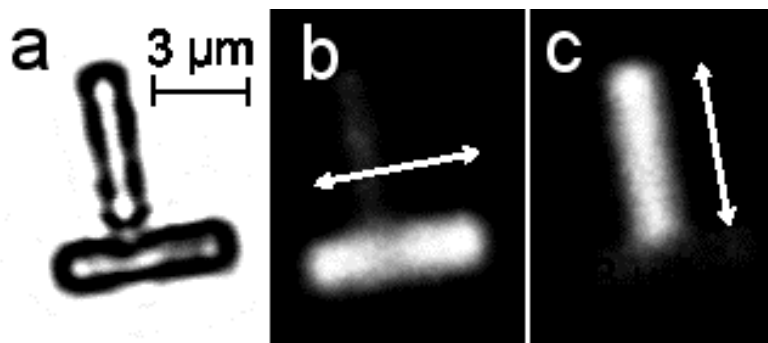


Abbildung 95: Während der Synthese zugegebener Stilbenderivatfarbstoff wird gleichmäßig und orientiert in den $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall eingebaut. a) Transmissionsbild b,c) Konfokale Fluoreszenzbilder, mit der durch die Pfeile angedeuteten Anregungspolarisation ($\lambda_{\text{ex}} = 442\ \text{nm}$).

Obwohl die Kristalle mit etwa $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser sehr klein sind, zeigen die Fluoreszenzbilder b und c gleichmäßig mit Farbstoff beladene Kristalle. Die Intensität des Fluoreszenzbildes ist sehr stark von der Polarisation des eingestrahlichten Lasers abhängig. In den Abbildungen 95 b und c fluoresziert jeweils nur der Kristall, dessen lange Achse parallel zur Polarisation des eingestrahlichten Lichtes ist. Der jeweils senkrecht dazu liegende andere Kristall ist nahezu nicht sichtbar. Wird, wie in diesem Fall, die Anregungspolarisation vor dem Dichroit gedreht, sind die Fluoreszenzintensitäten mit erhöhter Vorsicht zu interpretieren, da die Transmissionseigenschaften des Dichroiten bei manchen Wellenlängen sehr von der Polarisation des Lichtes abhängt. Eine ganz sichere Interpretation ist dann möglich, wenn wie hier ein horizontal und ein vertikal liegender Kristall im gleichen Bild beobachtet werden können. Da das Übergangsdipolmoment des Stilbenderivats entlang seiner langen Achse liegt, kann davon ausgegangen werden, daß der Farbstoff, ohne stärkere Störungen des Kristallgitters, orientiert und gleichmäßig in die Poren des Kristalls eingebaut wurde. Daß dies eher die Ausnahme als die Regel ist, kann anhand von weiteren Proben gezeigt werden.

Wird zu der $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Synthesemethode nach A. Glaue ein strukturell geringfügig verschiedener Farbstoff (Azofarbstoff) eingesetzt, so wird dieser nicht mehr gleichmäßig in den Kristall eingebaut, sondern wie aus Abbildung 96 ersichtlich ist nur in die Röhrenenden der entlang der langen Achse verlaufenden Poren des $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Gitters eingelagert.

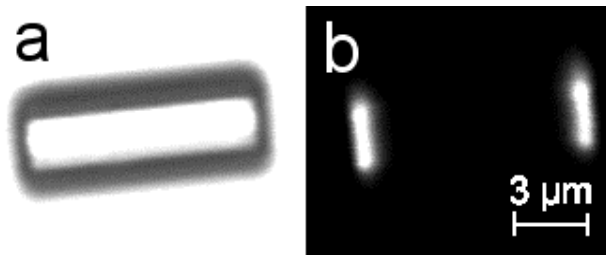


Abbildung 96: $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall bei dem zur Synthese ein Azofarbstoff zugegeben wurde. a) Transmissionsbild b) Fluoreszenzbild bei horizontaler Polarisation des Anregungslasers ($\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$).

Die gemessene Dicke der Fluoreszenzschicht entspricht mit 300 nm in etwa dem optischen Auflösungsvermögen, so daß die Dicke nur zu kleiner als 100 nm abgeschätzt werden kann. Polarisationsabhängige Messungen zeigen auch hier, daß der Farbstoff parallel orientiert in die Porenstruktur eingebaut wird. Nach der Interpretation von A. Glaue könnte es sein, daß nur ein Farbstoffmolekül am Ende einer Pore sitzt, welches während der des Wachsen des Kristalls entlang der Porenrichtung mitgeschoben wird. Zumindest sitzt der Farbstoff so fest in der Pore, daß er nicht mit Lösungsmitteln extrahiert werden kann. Die für einen Azofarbstoff ungewöhnliche starke Fluoreszenz [Rau1990] der Probe beruht vermutlich auf einer chemischen Umlagerung des Farbstoffes während der Synthese. Dies wird derzeit in der Arbeitsgruppe von P. Behrens genauer untersucht. Aus diesem Grund ist die chemische Struktur des Farbstoffes nicht bekannt und kann daher hier nicht angegeben werden.

Bei einer weiteren Probe wurde von Ö. Weiss zu einer Mikrowellensynthese von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ der Farbstoff DCM zugegeben. Dabei entstehen sehr große, schwach rot gefärbte Kristalle. Auch hier stört der etwa 10^{-5} molar zugegebene, für die $0,73 \text{ nm}$ große Pore erheblich zu große Farbstoff ($1,1 \text{ nm}$), nicht das Wachstum der Kristalle. Das Transmissionsbild in Abbildung 97 a zeigt einen dieser mit DCM beladenen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle.

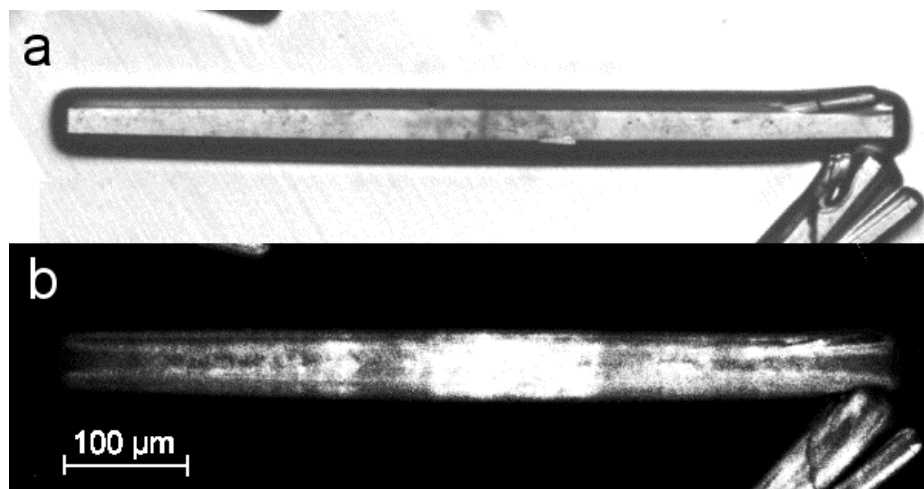


Abbildung 97: Übersichtsbild eines mit DCM beladenen großen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalls. a) Das Transmissionsbild zeigt nahezu perfekt gebaute Kristallnadeln b) Im konfokalen Fluoreszenzbild wird der stark heterogene Einbau des Farbstoffes sichtbar ($\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$).

Nicht selten sind diese Kristalle bis zu 1000 μm lang, doch mußte für das Übersichtsbild ein etwas kleineres Exemplar ausgesucht werden, da die maximale Bildgröße des Mikroskops auf 640 x 640 μm beschränkt ist (40x Objektiv). Im Transmissionsbild konnten nur wenige Baufehler entdeckt werden. Wie in der Abbildung 97 a am rechten Ende ersichtlich ist, sind manchmal kleine Kristalle aufgewachsen. Teilweise sind an einigen Stellen auch etwa 10 μm große, runde Stücke von der Oberfläche abgeplatzt (siehe Abbildung 87). Das konfokale Fluoreszenzbild in Abbildung 97 b zeigt jedoch, daß der Farbstoff im Inneren des Kristalls sehr ungleichmäßig verteilt ist. Obwohl die hellsten Stellen ohne ersichtliche Ordnung verteilt sind, ist zusätzlich auch eine regelmäßige Struktur erkennbar, die sich entlang der langen Kristallachse ausbreitet. Eine genauere Begutachtung zeigt, daß diese regelmäßige Struktur durch einen Ausschluß von Farbstoff entlang der zentralen Kristallachse zustande kommt. Der Ausschlußbereich vergrößert sich zum Kristallende hin bis fast auf den gesamten Kristalldurchmesser. Die verschiedenen konfokalen Querschnitte durch den Kristall in den Abbildungen 98 a bis c zeigen deutlich, wie sich der innere Bereich ohne Farbstoff mit zunehmender Distanz vom Kristallzentrum vergrößert.

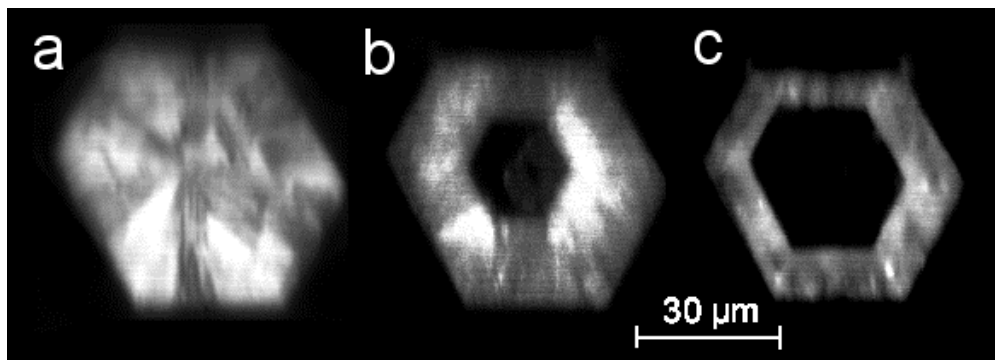


Abbildung 98: Konfokale Querschnitte durch einen mit DCM beladenen $\text{ALPO}_4\text{-5}$ Kristall a) durch die Mitte des Kristalls b) Auf halbem Weg zum Ende des Kristalls c) 30 μm vor dem Ende des Kristalls.

Aus den Transmissionsbildern und aus Anfärbeversuchen kann jedoch das Vorhandensein hohler Kristalle mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

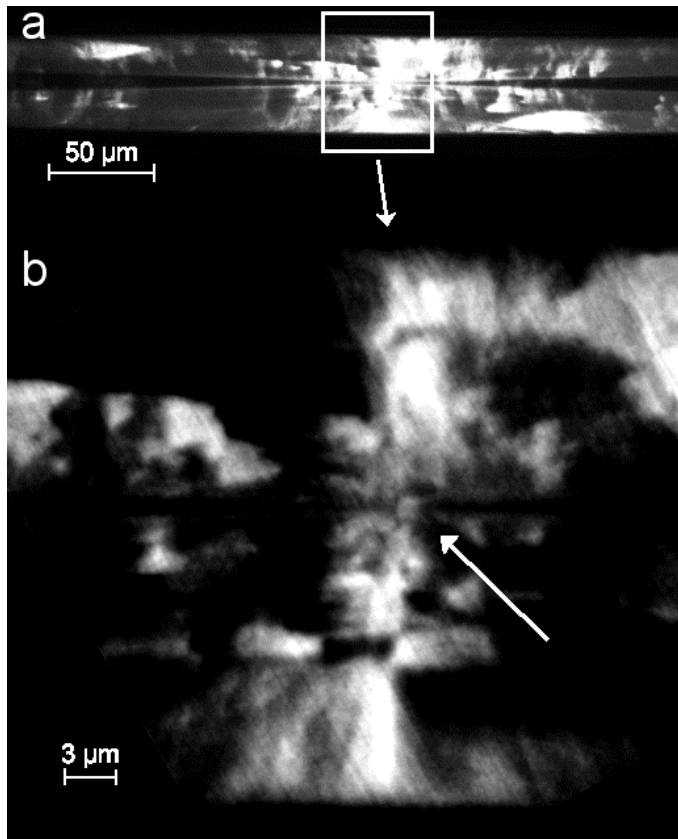


Abbildung 99: Konfokale Fluoreszenzbilder von der Mitte des Kristalls a) bei mäßiger Vergrößerung werden die unregelmäßigen Anhäufungen von Fluoreszenzfarbstoff in der Mitte des Kristalls gut sichtbar b) Schnitt durch das Kristallzentrum bei maximaler Vergrößerung. Der vermutliche Kristallkeim ist mit einem Pfeil markiert.

Die unregelmäßigen Bereiche mit hoher Farbstoffkonzentration sind überwiegend in der Mitte des Kristalls anzutreffen, wo auch das Wachstum des Kristalls bei der Synthese beginnt. In Abbildung 99 ist dieser innere Bereich vergrößert dargestellt. Ein etwa 1 µm großer Punkt in der Mitte von Abbildung 99 b liegt genau im Zentrum des Kristalls.

Eine ähnliche Probe wurde von M. Ganschow hergestellt. Hier wurden zu einer Synthese von etwa 15x35 µm großen, an den Enden spitzen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristallen gleichzeitig drei verschiedene Farbstoffe zugegeben. Die für diese Synthesemethode relativ großen Kristalle entstehen durch einen Fluorid Zusatz. Die Farbstoffe wurden so gewählt, daß die Emissionsspektren mit den Absorptionsspektren des nächsten Farbstoffes zusammenfällt. Dadurch soll ein Energieübertrag zwischen den Farbstoffen in der Reihenfolge Coumarin 40 - Rhodamin BE50 - Oxazin 1 erreicht werden. Die konfokalen Fluoreszenzbilder können zwar den Energieübertrag nicht beweisen, jedoch wird eine interessante Farbstoffverteilung beobachtet. Alle drei Farbstoffe sind größer als der innere Porendurchmesser von $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Die Abbildung 100 zeigt einen mit den drei Farbstoffen beladenen Kristall unter verschiedenen Aufnahmebedingungen.

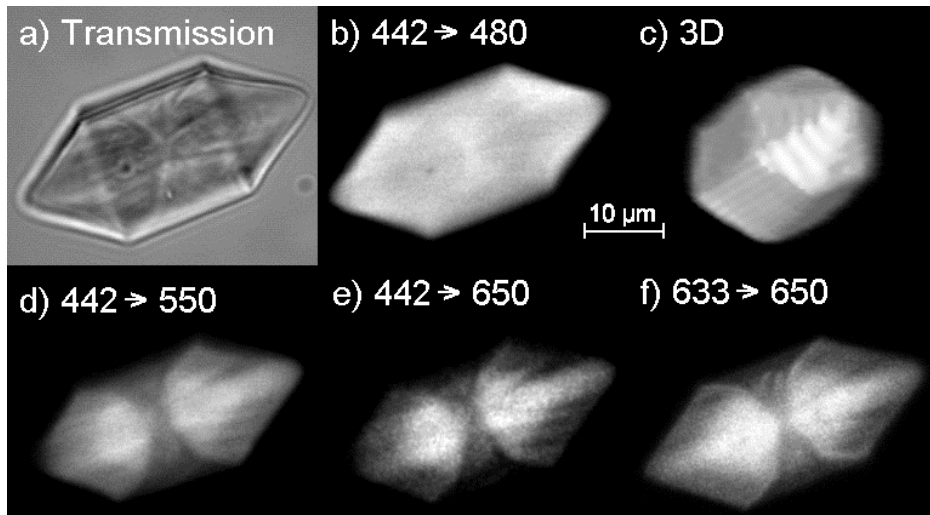


Abbildung 100: $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall der die Farbstoffe Coumarin 40, Rhodamin BE50 und Oxazin 1 enthält. a) Transmissionsbild, b) Fluoreszenzbild von Coumarin, c) 3 dimensionale Projektion der Coumarin Fluoreszenz, d) Fluoreszenzbild von Rhodamin, e) Fluoreszenzbild von Oxazin unter Anregung von Coumarin, f) Fluoreszenzbild von Oxazin. Die angegebenen Zahlen entsprechen den jeweiligen Anregungs- und Detektionswellenlängen.

Die Fluoreszenzbilder zeigen, daß der Farbstoff Coumarin 40 (100 b) gleichmäßig über den gesamten Kristall verteilt ist, während die anderen beiden Farbstoffe in einem charakteristischen Muster symmetrisch entlang der langen Kristallachse eingelagert werden. Im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen Einlagerungsmuster von DCM in sehr großen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristallen fällt auf, daß auch hier regelmäßige Farbstoffstrukturen vorhanden sind, die sich von der Mitte des Kristalls ausgehend zu den Enden erstrecken. Im Unterschied zu den großen mit DCM beladenen Kristallen ist jedoch keine farbstofffreie Längsachse im Kristall vorhanden. Vermutlich geht die charakteristische Fluoreszenzstruktur auf den Fluoridzusatz zur Synthese zurück, da sowohl hier, als auch bei den zuvor beschriebenen großen DCM/ $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristallen, Fluorid zugegeben wurde, andererseits aber auch mit Oxazin 1 beladene $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Proben vorhanden sind, die nicht mit Fluoridzusatz hergestellt wurden und eine gleichmäßige Fluoreszenzverteilung aufweisen (siehe Abbildung 122 im Kapitel 4.3.2.1).

Zu einer anderen Synthese wurde der Farbstoff Pyridin-2 zugegeben. In diesem Fall wird der Farbstoff relativ gleichmäßig in die $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle eingelagert. Abbildung 101 zeigt die konfokalen Längsschnitte durch einen dieser Kristalle.

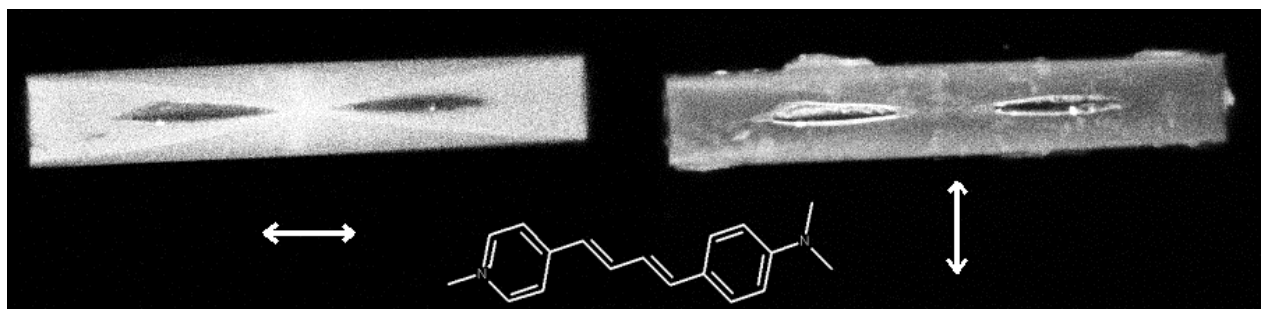


Abbildung 101: Pyridin-2 beladener $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall. Bei einer Anregungspolarisation

parallel zur langen Kristallachse (links) fluoresziert der gesamte Kristall relativ gleichmäßig. Entlang der zentralen Kristallachse breiten sich zwei längliche Hohlräume aus. Bei einer Anregungspolarisation quer zur langen Kristallachse wird ein sehr viel schwächeres Fluoreszenzsignal detektiert, da die Intensität im rechten Bild etwa 100-fach verstärkt wurde. Im unteren Bildteil ist die chemische Struktur von Pyridin-2 angegeben.

Bei diesen Kristallen entsteht entlang der langen Kristallachse ein Hohlraum, wie schon durch elektronenmikroskopische Aufnahmen an zerbrochenen Kristallen gezeigt werden konnte [Weiss]. Das sehr viel schwächere Fluoreszenzsignal bei einer Anregungspolarisation quer zur Kristallachse zeigt, daß die Pyridin-2 Farbstoffmoleküle sehr gut orientiert in den Kristall eingelagert werden. Lediglich ein dünner Rand an den eingeschossenen Hohlräumen zeigt eine etwas schlechtere Orientierungsverteilung.

4.1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß zur Herstellung eines homogen mit Farbstoff gefüllten Molekularsiebs verschiedene Bedingungen erfüllt sein müssen. Der Farbstoff muß von seiner Größe und chemischen Beschaffenheit zur Pore passen, für die Eindiffusion müssen die Poren frei zugänglich sein und es dürfen keine Risse oder Defekte im Kristall vorhanden sein. Oft bleiben die Gründe für eine ungleiche Farbstoffverteilung in Kristall jedoch unbekannt.

4.2 Dynamik an vielen Molekülen (Ensemble)

Durch eine Aufnahme von nicht nur einem Bild, sondern einer Abfolge von Bildern, kann die zeitliche Änderung der Farbstoffkonzentration verfolgt werden. Dazu ist zu Beginn des Versuchs eine Konzentrationsverteilung nötig, die weit vom Gleichgewichtszustand entfernt ist. Dieser anfängliche Nichtgleichgewichtszustand kann zum Beispiel durch schnelle Zugabe von Farbstoff oder Ausbleichen erreicht werden. Der Geschwindigkeitsverlauf, mit dem sich anschließend der Gleichgewichtszustand einstellt, läßt Rückschlüsse auf interne dynamische Prozesse von Farbstoffmolekülen und deren Diffusionsverhalten zu.

Wird eine Farbstofflösung zu einem Stück des aus hexagonal angeordneten Poren aufgebauten M41S Monolithen zugegeben, so diffundiert der Farbstoff innerhalb weniger Stunden in das Innere der Probe ein. Die Durchführung und Interpretation dieses scheinbar einfachen Versuches bringt jedoch einige Schwierigkeiten mit sich. Um Messungen über einen längeren Zeitraum durchzuführen sind nichtflüchtige Lösungsmittel wie Glycerin, Ethylenglykol oder Benzylalkohol erforderlich, die jedoch meist polar sind und damit unpolare Farbstoffe wie TDI oder Tetracen nicht lösen. Als Alternative werden längere Alkane wie Dodekan und Hexadekan gewählt, die die unpolaren Farbstoffe gerade noch gut genug lösen und sich aufgrund ihres kleinen Dampfdruckes nicht verflüchtigen. In Abbildung 102 ist die Versuchsdurchführung skizziert.

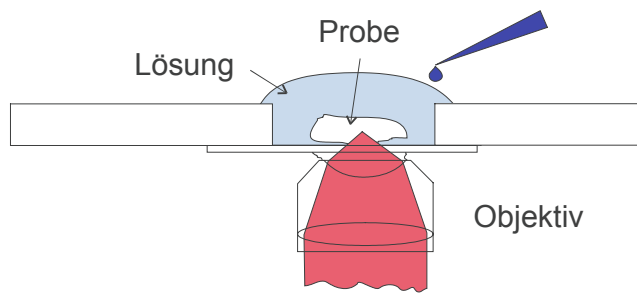


Abbildung 102: Zugabe von Farbstofflösung während der Messung durch einen durchbohrten Objektträger

Während der Aufnahme einer Bilderserie wird die Farbstofflösung zu einer bereits im Lösungsmittel eingebetteten Probe seitlich zutropft. Dabei ist zu beachten, daß durch den Zutropfvorgang die Kristalle nicht bewegt werden. Der Farbstoff verteilt sich innerhalb einiger Sekunden gleichmäßig über den gesamten Probenraum. Bei der Aufnahme und der Interpretation der Bilder muß berücksichtigt werden, daß der Farbstoff von allen Seiten in den Kristall eindringen kann. Da das Volumen der Probe meist sehr viel kleiner ist als das der Lösung, bleibt die Farbstoffkonzentration in der Lösung lange Zeit konstant.

4.2.1 Monolith

Das Eindringen von Farbstoff in die Poren des mesoporösen M41S Monoliths kann gut verfolgt werden. Abbildung 103 zeigt wie mit fortschreitender Zeit der Farbstoff in das Innere des Festkörpers eindringt.

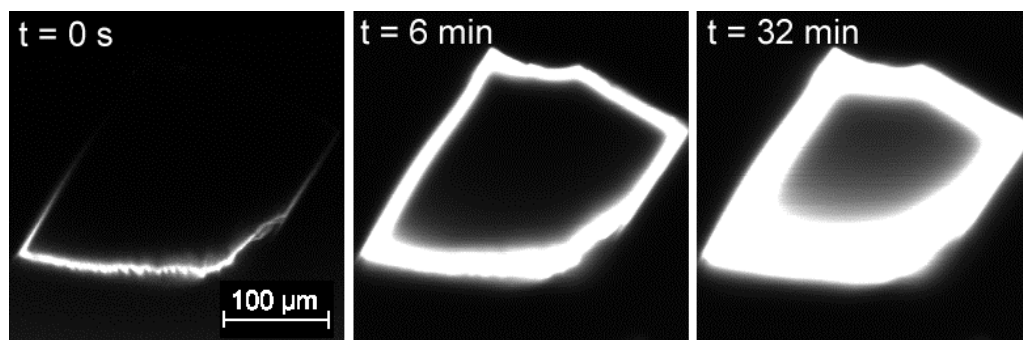


Abbildung 103: Eindringen von Stilbenfarbstoff in die Poren eines M41S Monolithen. Der Farbstoff wurde zeitgleich zum Start der Bildaufnahme des ersten Bildes bei $t = 0$ s zugegeben. Nachdem etwa das halbe Bild aufgenommen wurde (ca. 15s), hat der Farbstoff die Meßstelle erreicht und eine dünne Schicht an der Oberfläche des Monolithen beginnt zu fluoreszieren.

Schon nach wenigen Minuten ist der Farbstoff einige μm tief in den Festkörper hineindiffundiert. Jedoch dauert es fast einen Tag, bis eine gleichmäßige Verteilung erreicht wird. Genau solch ein verlangsamtes Fortschreiten des Diffusionsvorganges wird von der Theorie erwartet. Nach Gleichung (3) ist für ein doppelt so weites Fortschreiten der Diffusion die vierfache Zeit nötig. Zu einem bestimmten Zeitpunkt ist nach den Diffusionsgesetzen der Verlauf der Farbstoffkonzentration entlang der Diffusionsrichtung eine abfallende Fehlerfunktion (siehe Formel (14)). Bei dieser Funktion ist die mittlere Eindringtiefe diejenige Tiefe, bei der die Konzentration, und

daher auch das Fluoreszenzsignal, vom Rand her auf den relativen Wert 0.317 abgefallen ist. Die Genauigkeit der Bestimmung dieser Eindringtiefe kann sehr verschieden sein. Bei sehr geringer Eindringtiefe erschwert eine Verbreiterung des Intensitätsverlaufes durch die Faltung mit dem optischen Auflösungsvermögen des Mikroskops die Messung; bei langen Eindiffusionszeiten kann die Farbstoffkonzentration in der umgebenden Lösung z.B. durch fortschreitende Absorption schwanken.

Abbildung 104 zeigt das Intensitätsprofil des Fluoreszenzsignals von Tetracen senkrecht zur Oberfläche.

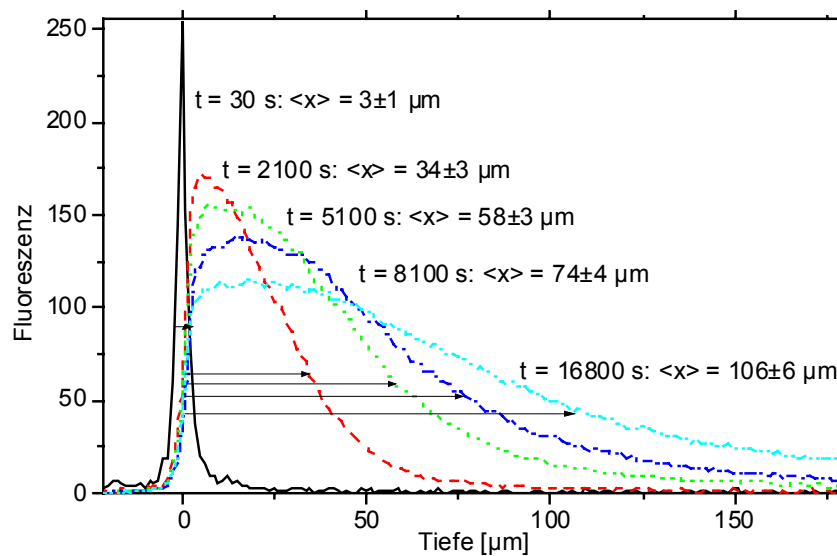


Abbildung 104: Eindiffusion von Tetracen gelöst in Dodekan in einen bei 600°C kalzinierten M41S Monolith. Die Pfeile geben die mittlere Eindringtiefe σ an.

Zur Ermittlung der mittleren Eindringtiefe σ wird diejenige Tiefe ermittelt, bei der das Fluoreszenzsignal auf etwa 0.317 gegenüber dem Maximum an der Oberfläche angenommen ist. Die Diffusionskonstante D kann nach Gleichung (11) an die erhaltenen Eindringtiefen angepaßt werden. Das Beispiel in Abbildung 105 zeigt, daß die mit einer Diffusionskonstante von $D = 3.3 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ angepaßte Kurve die Meßwerte gut repräsentiert.

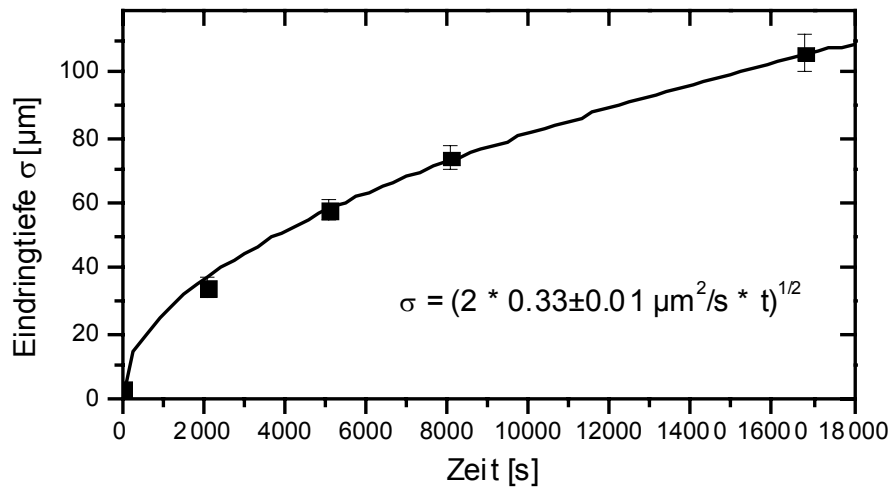


Abbildung 105: Die mittlere Eindringtiefe des Farbstoffes Tetracen in den kalzinierten Monolith ist wurzelförmig von der Zeit abhängig. Die angepaßte Kurve nach Gleichung (11) entspricht einer Diffusionskonstante von $D = 3.3 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Die Abbildung 106 zeigt eine Meßreihe mit vier verschiedenen Farbstoffen und jeweils dem nicht kalzinierten und dem kalzinierten Monolith.

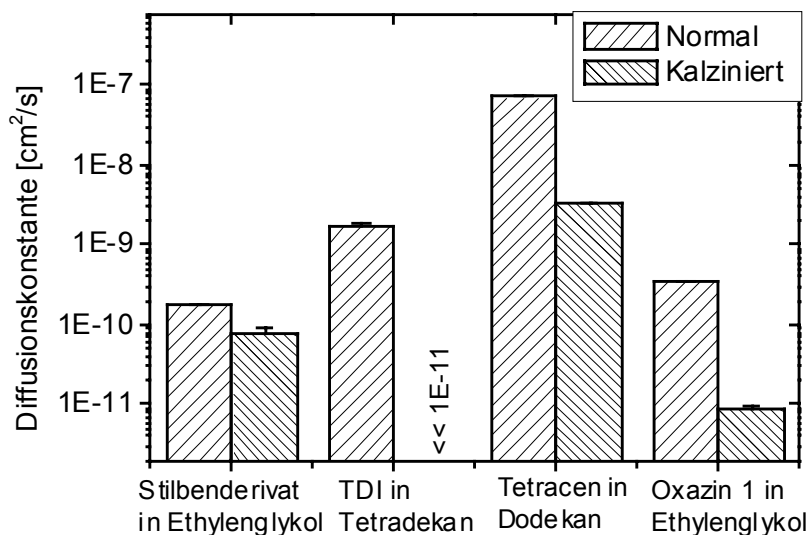


Abbildung 106: Ermittelte Diffusionskonstanten für die Eindiffusion von Farbstoffen in monolithisches M41S.

Die ungewöhnlich geringe Diffusionskonstante von TDI in den kalzinierten Monolith, kann hier auch an einer Alterung der Probe liegen, da in diesem Fall die Probe zwischen Kalzinierung und Untersuchung 12 Monate an Luft gelagert wurde.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muß immer ein Verdrängungsprozess berücksichtigt werden. In den kalzinierten Proben muß das Farbstoffmolekül das vorgelegte Lösungsmittel verdrängen. In den nicht kalzinierten Proben dringt das Lösungsmittel zusammen mit dem Farbstoff in die mit dem Flüssigkristall der Synthese gefüllten Poren ein.

Aus der Versuchsreihe sind verschiedene Tendenzen ableitbar. Die unpolaren Farbstoffe TDI und Tetracen diffundieren schneller als die polaren Farbstoffe, was zumindest bei den kalzinierten Proben auch am viskoserem Ethylenglykol als Lösungsmittel der polaren Farbstoffe liegen kann. Die Eindiffusion verläuft in den kalzinierten Proben langsamer als in den nicht kalzinierten. Da bei den nicht kalzinierten Proben sicher auch das Lösungsmittel mit eindiffundiert, liegt hier eine Mischung von Templat und Lösungsmittel im Inneren der Poren vor. Auch ein Größeneffekt wird beobachtet. Bei den polaren bzw. unpolaren Farbstoffen diffundiert jeweils das schlankere Tetracen bzw. Stilbenderivat Molekül schneller in den Festkörper ein.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, daß die Eindiffusion von Farbstoff in einen Festkörper mit dem konfokalen Mikroskop direkt beobachtet werden kann. Je nach Farbstoff, Lösungsmittel und Vorbehandlung des M41S Monoliths werden Diffusionskonstanten im Bereich von unter 10^{-11} cm²/s bis 10^{-7} cm²/s gemessen.

4.2.2 UTD-1

Durch eine spezielle Synthese konnte Ralph Jäger [Jäger] sehr große UTD-1 Kristalle herstellen (siehe Kapitel 3.2.2). Abbildung 107 zeigt diese ungewöhnlich großen UTD-1 Kristalle, die als Büschel aufwachsen, aus denen einige gerade Nadeln herausstehen.

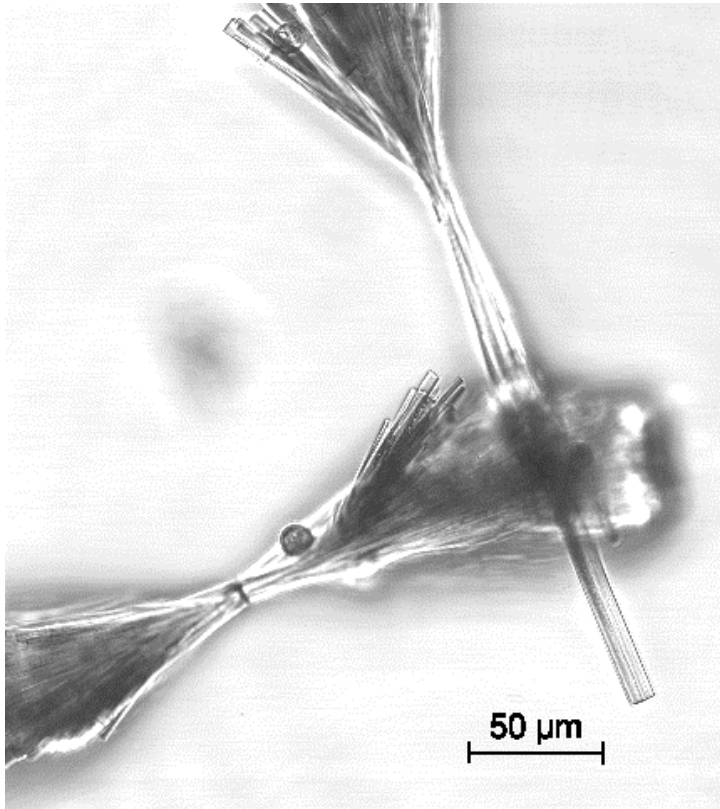


Abbildung 107: Lichtmikroskopische Transmissionsaufnahme von großen, kalzinierten und extrahierten UTD-1 Kristallen.

Die einzelnen Nadeln sind mit bis zu 10 μm Durchmesser und über 100 μm Länge etwa eine Größenordnung größer als in der Literatur [Wessels1999] (siehe Abbildung 71 in Kapitel 3.2.2) beschrieben. Bei der Kalzinierung bei 600°C zerfällt das Templat, ein organische Kobaltkomplex vermutlich in schwarzes Kobaltoxid, welches durch längeres Extrahieren mit verdünnter Salzsäure zum größten Teil entfernt wurde. Die so erhaltenen Kristalle sind nur noch sehr schwach grau gefärbt und zeigen bei einer Anregungswellenlänge von 442 nm nur ein schwaches unstrukturiertes Lumineszenzsignal, während bei einer Anregungswellenlänge von 632 nm neben wenigen einzelnen unbekanntem Molekülen mit einem Emissionsmaximum von ca. 700 nm kein starker fluoreszierender Untergrund detektierbar ist. Auch hier soll versucht werden die Eindiffusion von Farbstoff in das Porensystem zu verfolgen. Die Höhe eines TDI Moleküls paßt mit 0,91 nm sehr gut in die Poren des UTD-1 mit 1,0 nm Durchmesser.

Die Probe wird in Dodekan eingebettet und mit einer verdünnten Lösung von TDI in Dodekan versetzt. Abbildung 108 zeigt den Verlauf der Diffusion zu vier verschiedenen Zeiten. Im ersten Bild bei $t = 0$ s tauchen, nachdem das Bild etwa halb aufgenommen wurde, die ersten Moleküle auf. Die TDI Moleküle diffundieren in der freien Lösung sehr schnell, so daß sie nur während der Aufnahme einer Zeile als horizontaler Strich sichtbar sind. Nach etwa 30 s wurden einige Moleküle an der Oberfläche adsorbiert, so daß helle runde Punkte sichtbar werden.

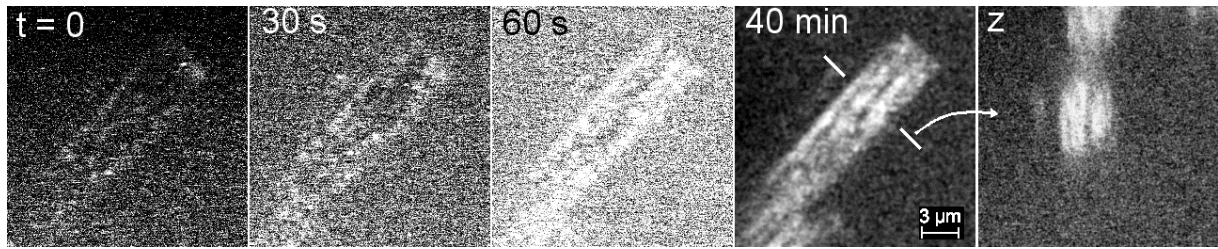


Abbildung 108: Zeitlicher Verlauf der Eindiffusion von TDI in einen kalzinierten UTD-1 Kristall. Für das Bild nach 40 min wurde die Empfindlichkeit der Detektion verringert, um eine Überbelichtung zu vermeiden. Ein anschließender z-Schnitt (z-Mitte) zeigt, daß der Farbstoff in das Innere des Kristalls vorgedrungen ist. Über der Kristallnadel ist noch eine weitere Nadel sichtbar.

Der Kristall liegt leicht schräg in der Bildebene, so daß nur der Bereich rechts oben sicher im Inneren des Kristalls gemessen wird. Dorthin sind nach 30 s noch keine TDI Moleküle vorgedrungen. Aber schon nach 60 s ist auch im Inneren Farbstoff detektierbar. Mittlerweile ist die Konzentration an Farbstoff schon so groß, daß die einzelnen Moleküle nicht mehr getrennt aufgelöst werden können. Nach 40 Minuten ist im Inneren des Kristalls schon so viel Farbstoff vorhanden, daß die Anregungsleistung auf 1/3 verringert wurde. Entlang der Kristallachse sind Streifen erkennbar, an denen der Farbstoff überwiegend angelagert wird. Das rechte Bild zeigt einen z-Schnitt senkrecht durch den Kristall. Da das axiale Auflösungsvermögen des konfokalen Mikroskopes unter $1\ \mu\text{m}$ liegt, muß die detektierte Fluoreszenz aus dem Inneren des etwa $5\ \mu\text{m}$ dicken Kristalls stammen. Die Abhängigkeit von der Anregungspolarisation zeigt Abbildung 109.

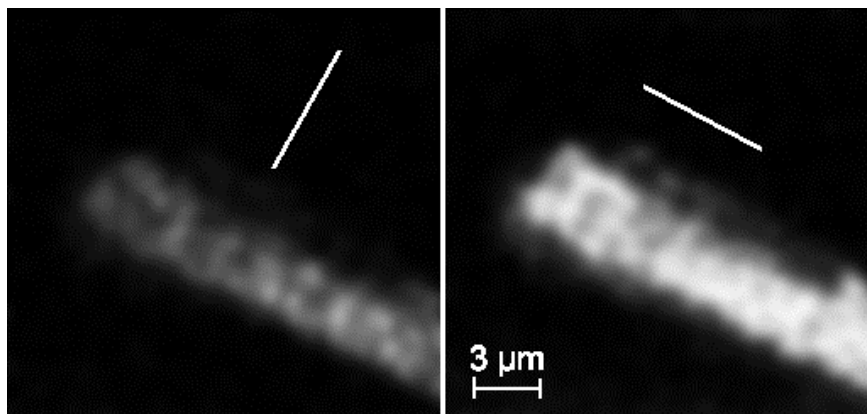


Abbildung 109: Bilder mit senkrecht und parallel zur Kristallachse orientiertem Anregungslaser zeigen, daß die Übergangsdipolmomente der Farbstoffe bevorzugt entlang der langen Kristallachse, die der Porenrichtung entspricht, orientiert sind.

Wird die Anregungspolarisation parallel zur langen Kristallachse gedreht, so kann ein mindestens 3 mal helleres Fluoreszenzbild detektiert werden wie mit senkrecht orientierter Anregungspolarisation. Daraus kann geschlossen werden, daß die TDI Moleküle vorzugsweise entlang der Porenrichtung orientiert sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich auch kleine Risse entlang der Porenrichtung durch den Kristall ziehen, welche den Farbstoff aufnehmen und entlang der Reißrichtung orientieren. Die elektronenmikroskopische Aufnahme (Abbildung 71 im Kapitel 3.2.2) des nicht kalzinierten UTD-1 zeigt Risse entlang der Kristallnadeln.

Absorptionsversuche mit N₂ und Dioxinen, die R. Jäger durchgeführt hat, zeigen ein sehr viel kleineres Porenvolumen als von den Strukturdaten berechnet wird [Jäger2002]. Vermutlich sind viele Poren verstopft oder nur schwer zugänglich. Bei den hier durchgeführten Absorptionsversuchen mit Fluoreszenzfarbstoffen reichen aber einige wenige frei zugängliche Poren aus, um den Festkörper im optischen Bild gleichmäßig mit Farbstoff zu beladen.

Zusammenfassend zeigen die Eindiffusionsuntersuchungen an den kalzinierten UTD-1 Kristallen, daß einzelne TDI - Moleküle recht schnell in das Innere vordringen können. Ob der Farbstoff jedoch in die Poren oder in Risse des Kristall eingelagert wird, kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

4.2.3 M41S Nadeln

Bei Messungen mit vielen Molekülen ist die Diffusion nach dem Einstellen des Gleichgewichts nicht mehr detektierbar. Erst durch eine äußere Störung des Gleichgewichts können dynamische Prozesse beobachtet werden. Dies kann durch Ausbleichen wie bei der etablierten Methode FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching, siehe Kapitel 2.4.3) erreicht werden.

Es gibt eine spezielle Synthese des mesoporösen M41S Materials, bei dem große Nadeln erhalten werden (siehe Kapitel 3.2.4). Einige bei der Synthese mit sehr wenig Rhodamin 6G beladene Nadeln wurden von F. Marlow zur Verfügung gestellt. Entgegen ersten Annahmen konnte gezeigt werden, daß die Poren nicht entlang der langen Achse der Nadeln verlaufen, sondern zirkular [Marlow2000]. Dadurch haben die Poren keine nach außen gerichtete Öffnung. Diffusionsexperimente bei Zugabe von TDI oder Tetracen zeigen jedoch, daß nach mehreren Tagen durchaus Farbstoff in das Innere der Faser eingedrungen ist. Vermutlich besitzen die Wände der Röhren Löcher, durch die der Farbstoff von einer Röhre zur nächsten Röhre gelangen kann. Abbildung 110 zeigt den Schnitt durch eine Nadel, die mehrere Tage in einer TDI in CHCl₃ Lösung gelegt wurde.

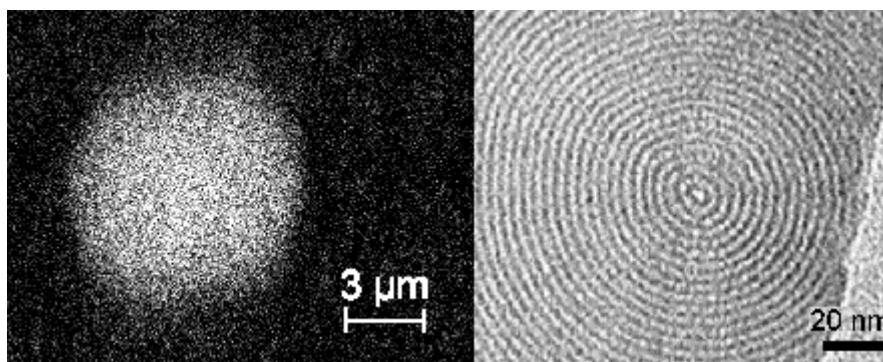


Abbildung 110: Konfokaler z-Schnitt ($\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$) durch eine nachträglich mit TDI beladene M41S Nadel (links). Rechts zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild den zirkularen Aufbau der Poren aus der gleichen Blickrichtung [Marlow2000].

Durch eine zeitabhängige Untersuchung der Eindiffusion von Farbstoff konnte jedoch keine sinnvolle Diffusionskonstante ermittelt werden. Der Kristall wurde langsam aber gleichmäßig im Inneren heller. Der Farbstoff kann wohl nur langsam durch die Porenwand dringen, wird aber schnell entlang der Poren im Kristall verteilt.

Bleichexperimente ermöglichen eine grobe Abschätzung der Diffusionskoeffizienten innerhalb des Kristalls. Dazu wird eine Kristallnadel, die während der Synthese mit Rhodamin 6G beladen wurde, in PMMA fixiert und an einer Stelle bestrahlt. Abbildung 111 zeigt, wie ein ausgebleichenes Loch langsam wieder zudiffundiert.

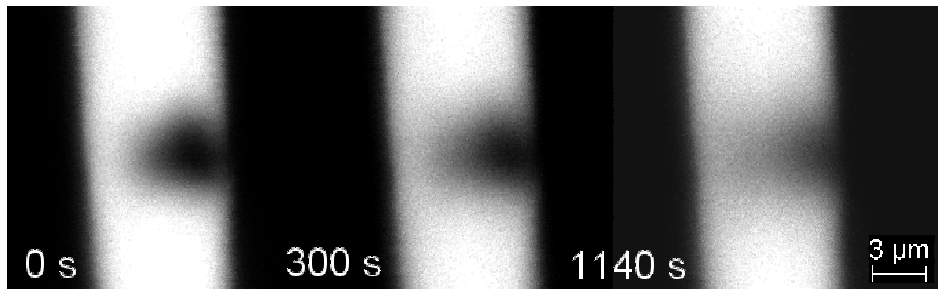


Abbildung 111: Drei Bilder einer 20 Bilder langen Serie zeigen, wie sich eine ausgebleichene Stelle in einer mit Rhodamin 6G beladenen M41S Nadel durch Diffusion innerhalb weniger Minuten wieder schließt.

Das Loch verbreitert sich mit zunehmender Zeit. Betrachtet man das Fehlen von Farbstoff als die diffundierende Spezies kann die sich verbreiternde Lochform mit Gleichung (6) beschrieben werden. Ein punktförmiges Loch verbreitert sich demnach gaußförmig. Die Abbildung 112 zeigt exemplarisch je zwei Fluoreszenzintensitätsprofile entlang und senkrecht der Nadel durch die Mitte des ausgebleichenen Loches.

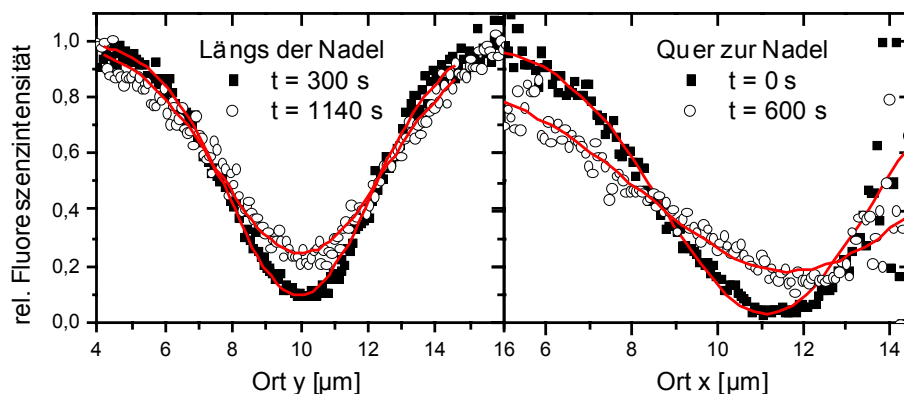


Abbildung 112: Jeweils zwei exemplarische Intensitätsprofile, die aus den entsprechenden Bildern aus Abbildung 111 entlang und senkrecht der Nadel gewonnen wurden, zeigen ein gaußförmiges Profil. Die mittleren Diffusionslängen σ konnten so nach Gleichung (6) zu $2,1 \mu\text{m}$ (300 s) und $2,47 \mu\text{m}$ (1140 s) entlang der Nadel und $2,4 \mu\text{m}$ (0 s) und $3,4 \mu\text{m}$ (600 s) senkrecht zur Nadel bestimmt werden.

Diese Intensitätsprofile können gut mit einer nach unten gerichteten Gaußkurve angepaßt werden. Leider kann das Loch zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ s}$ nicht punktförmig klein gemacht werden, da zum einen die Fokussierung des Lasers beschränkt ist und zum anderen der Bleichvorgang einige Minuten dauert. Zur Auswertung wird daher ein

virtueller Zeitpunkt so angepaßt, als ob zu diesem Zeitpunkt ein punktförmiges Loch vorhanden gewesen wäre. Dieses Verfahren funktioniert nur deshalb, weil das ausgebliehene Loch schon von Anfang an einen gaußförmigen Verlauf besitzt. Wie aus Abbildung 113 ersichtlich ist, beschreibt dieses Modell die ermittelten Lochbreiten sehr gut und es kann eine Diffusionskonstante entlang der Nadel zu $9.95 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ und senkrecht zur Nadel zu $8,3 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmt werden.

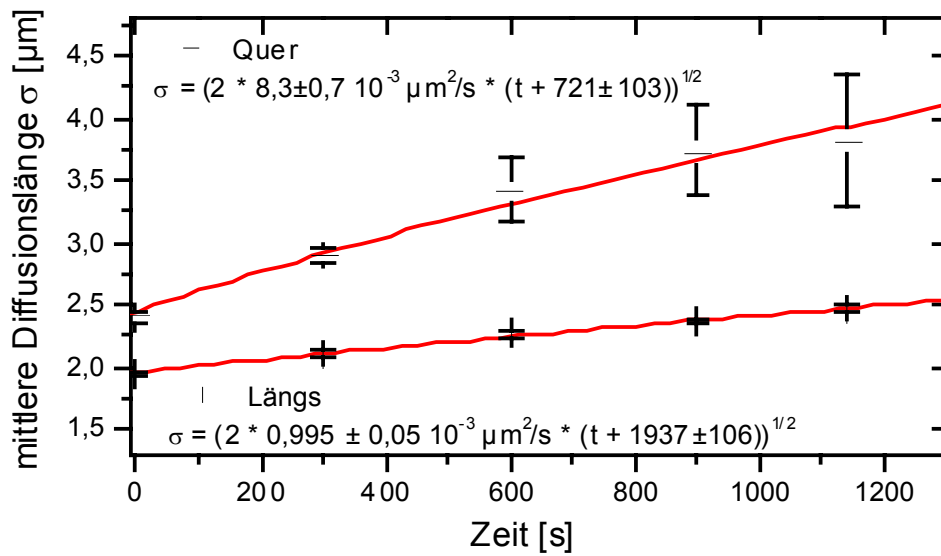


Abbildung 113: Ermittlung der Diffusionskonstanten aus den mittleren Diffusionslängen quer (oben) und längs (unten) der M41S Nadel.

Der Fehler liegt unter 10%. Verschiedene Modelle sind für den inneren Aufbau der Nadeln denkbar (siehe Abbildung 114).



Abbildung 114: Mögliche Porenstrukturen der M41S Nadeln.

Die Diffusion entlang der Nadel ist etwa um eine Größenordnung verlangsamt, was zum einen durch einen schraubenförmigen Aufbau der Porenstruktur, zum anderen durch Diffusion durch die Porenwand erklärt werden kann. Da aufgrund von TEM Bildern ein spiralförmiger Aufbau unwahrscheinlich ist, kommt für die ermittelte Diffusionskonstante quer zur Nadel nur die Diffusion durch die Wand oder die Diffusion in zirkularen Poren in Frage. Eine Interpretation der ermittelten Diffusionskonstanten hinsichtlich einer Diffusion in den Poren und zwischen den Poren ist somit nicht eindeutig. Wenn man jedoch davon ausgeht, daß die Diffusion entlang den Poren schneller ist als die Diffusion durch die Wand, so ist die reale Diffusionskonstante entlang einer Pore mindestens so groß wie die senkrecht zur Nadel bestimmte Größe von $8,3 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß in den nadelförmig aufgebauten M41S Material eine deutliche Anisotropie in der Diffusion vorhanden ist. Quer zur Nadel wird eine um eine Größenordnung schnellere Diffusion gemessen.

4.2.4 Photoprodukte

Neben der Dynamik durch Bewegung wie Diffusion oder Rotation kann auch die Reaktionsdynamik untersucht werden. Das Photobleichverhalten von Farbstoffen ist eine wichtige Größe in Bezug auf technische Anwendungen und die Durchführbarkeit von Experimenten mit einzelnen Molekülen. Es gibt Untersuchungen, die eine erhöhte Photostabilität von Farbstoffen durch den Einschluß in ein Porensystem erhalten [Schomburg2001]. Jedoch konnte hier bei keiner der untersuchten Proben eine erhöhte Photostabilität beobachtet werden. Gegenüber vergleichbaren Polymerproben wurde eher eine (etwa eine Größenordnung) geringere Stabilität gefunden [Hellriegel2000]. Auch eine Erholung des geblichenen Farbstoffes durch die reversible Bildung eines Photoprodukts ist möglich. Abbildung 115 zeigt dafür zwei Beispiele.

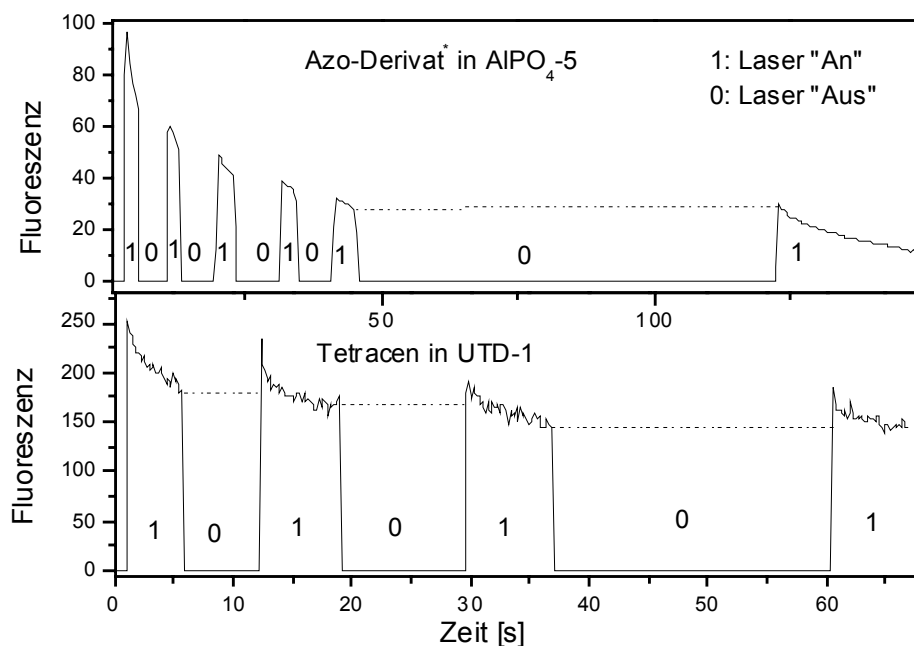


Abbildung 115: Photobleichen von zwei verschiedenen Proben. Während sich die Probe mit dem Azofarbstoff in den Bestrahlungspausen nicht verändert, erholt sich die Fluoreszenz der Tetracen Probe geringfügig. λ_{ex} jeweils 442 nm.

Die Farbstoffe bleichen während der Bestrahlung mit blauem Laserlicht. Während der Untersuchung wird jedoch für einige Zeit der Laser kurzzeitig ausgestellt und das Fluoreszenzsignal nach dem Wiedereinschalten beobachtet. Beim Azofarbstoff (bzw. dem unbekannten Farbstoff, der bei der Synthese entstanden ist, siehe Kapitel 4.1.4) kann keine Veränderung beobachtet werden, während das Fluoreszenzsignal des Tetracens nach den Bestrahlungspausen deutlich erhöht ist. Ob es sich bei der

Erholung um eine Umorientierung oder eine photochemische Reaktion handelt, konnte auch durch polarisationsabhängige Messungen nicht eindeutig geklärt werden.

4.3 Fluoreszenzimagining einzelner Moleküle

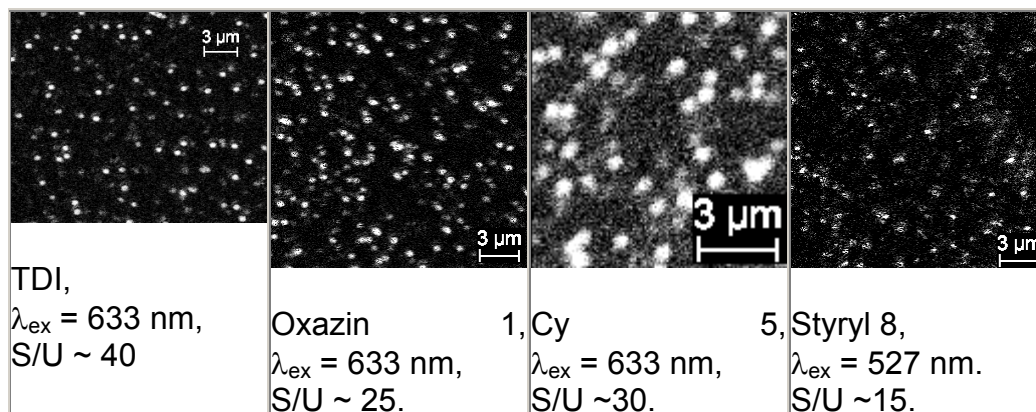
Dieses Kapitel beschreibt die orts aufgelöste Detektion von einzelnen fluoreszierenden Molekülen. Zur Erzeugung von Bildern wird der Punkt, der das konfokale Volumenelement enthält, über die Probe gerastert. In xy-Richtung wird hierbei der Laserstrahl mittels zweier beweglicher Spiegel abgelenkt, zur z-Auflösung kann das Mikroskopobjektiv an die Probe heran bewegt werden.

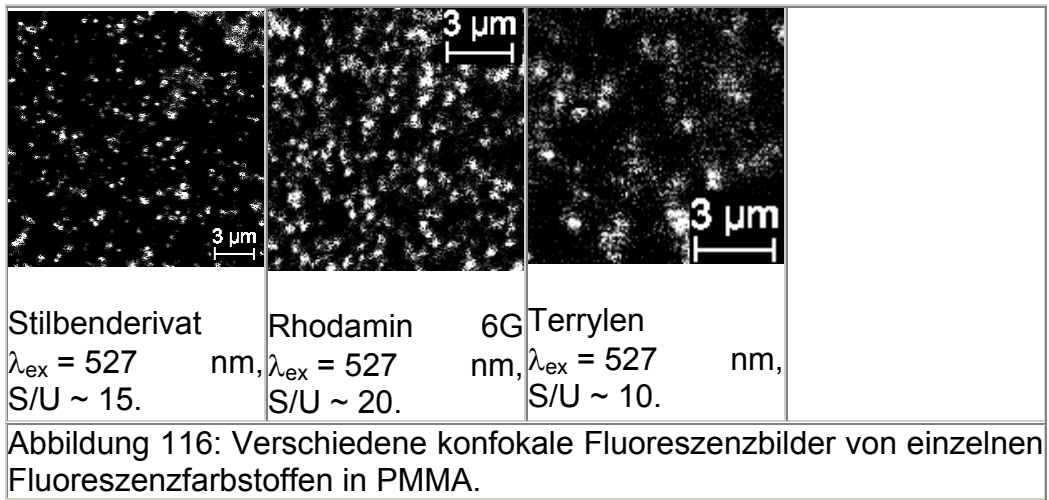
4.3.1 Referenzmessungen in dünnen Polymerproben:

Zur Charakterisierung der Farbstoffmoleküle werden Referenzproben hergestellt, bei denen der Farbstoff in einer sehr dünnen Polymerschicht auf ein Deckglas aufgebracht wird. Als Trägerpolymer hat sich das transparente Polymethylmethacrylat (PMMA) sehr bewährt, das mittels "Spincoating" als dünne Schicht auf ein Deckglas aufgebracht wird (siehe Kapitel 2.6.1.7). Werden die Proben anschließend mit Epoxidharz wasserdicht versiegelt, sind sie gut haltbar und erfreuen auch die Nachbarlabore. Können in einer solchen Referenzprobe die einzelnen Farbstoffmoleküle gut detektiert werden, so ist sichergestellt, daß Mikroskop, Laser, Filter und Detektion einwandfrei abgestimmt sind und einer Detektion dieser Farbstoffmoleküle in einer anderen Probe nichts Grundlegendes im Wege steht.

4.3.1.1 Verschiedene Farbstoffe

Die Abbildung 116 zeigt konfokale Fluoreszenzbilder verschiedener Farbstoffmoleküle, bei der jeweils angegebenen Laserwellenlänge. Als Polymerträger wurde PMMA verwendet. Bei einer Anregung mit 633 nm sind von den photostabilen Farbstoffen Bilder mit sehr gutem Signal zu Untergrund Verhältnis detektierbar, bei kurzwelliger Anregung ist der Untergrund stärker.





Aufgrund der hohen Rastergeschwindigkeit des konfokalen Mikroskops ist die Belichtungszeit eines Meßpunktes auf kürzer als 1 ms beschränkt. In dieser Zeit können unter besten Bedingungen einige hundert Photonen detektiert werden. Ein Fluoreszenzpunkt, der die Größe von ca. 4x4 Bildpunkten besitzt, wird somit aus etwa 2000 detektierten Photonen gebildet. Die maximale sinnvolle Rastergeschwindigkeit ist dann erreicht, wenn pro Meßpunkt ein Photon detektiert wird. Dann ist der Kontrast so hoch, daß nur zwischen einem Photon und keinem Photon unterschieden werden kann. Ein Fluoreszenzpunkt besteht dann aus etwa 4x4 hellen Bildpunkten, die von nur 16 detektierten Photonen herrühren. Photonen, die vom Untergrund stammen, sind dagegen gleichmäßig über das Bild verteilt und somit von den einzelnen Molekülen unterscheidbar. Ein Beispiel für ein solches sehr schnell aufgenommenes Bild zeigt Abbildung 117, bei dem die Verweilzeit von 4 μs auf jedem Bildpunkt gerade ausreicht, um sicher ein Photon des Farbstoffmoleküls zu detektieren.

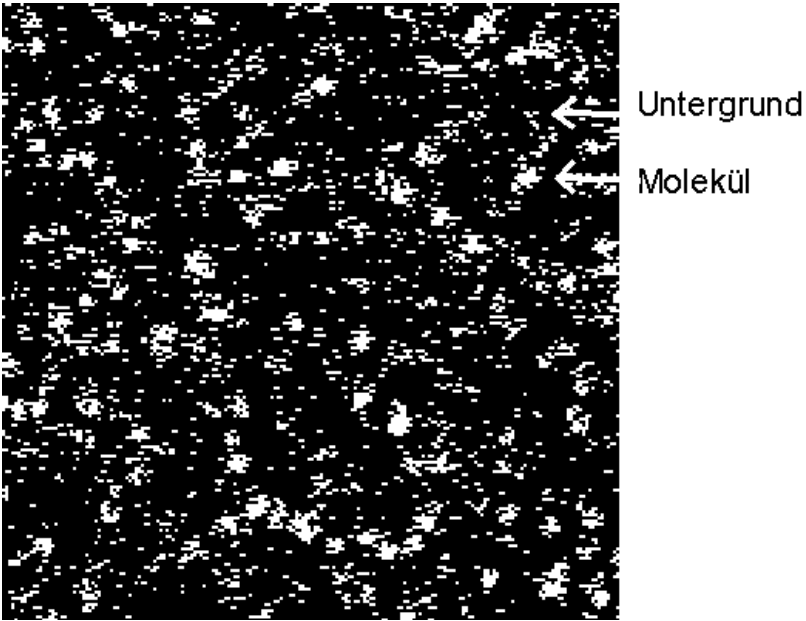


Abbildung 117: Ausschnitt aus einem in 1 s aufgenommenen konfokalen Bild von einzelnen TDI Molekülen mit 512x512 Punkten. Die Meßzeit auf einem Bildpunkt beträgt nur 4 μs . Einzelne Moleküle sind als Häufung von hellen Bildpunkten sichtbar.

4.3.1.2 Ortsgenauigkeit

Die Bestimmung der Ortskoordinaten eines einzelnen Moleküls ist nicht durch das Auflösungsvermögen des Mikroskops bestimmt, sondern von der Genauigkeit, mit der das Zentrum des detektierten Signals bestimmt werden kann. Nach Bartko et al. [Bartko1999] ist zur exakten Positionsbestimmung zusätzlich die Orientierung des Übergangsdipolmomentes nötig, da zumindest bei einer Detektion mit einem Flächendetektor die dipolartige Abstrahlcharakteristik des Farbstoffmoleküls berücksichtigt werden muß. Zur Bestimmung des Maximums einer Gaußfunktion ist das Signal zu Rausch Verhältnis, mit dem das einzelne Molekül detektiert werden kann, entscheidend [Boroff1986]. Abbildung 118 zeigt, wie sich mit verbesserndem Signal zu Rausch Verhältnis die Positioniergenauigkeit drastisch verbessert.

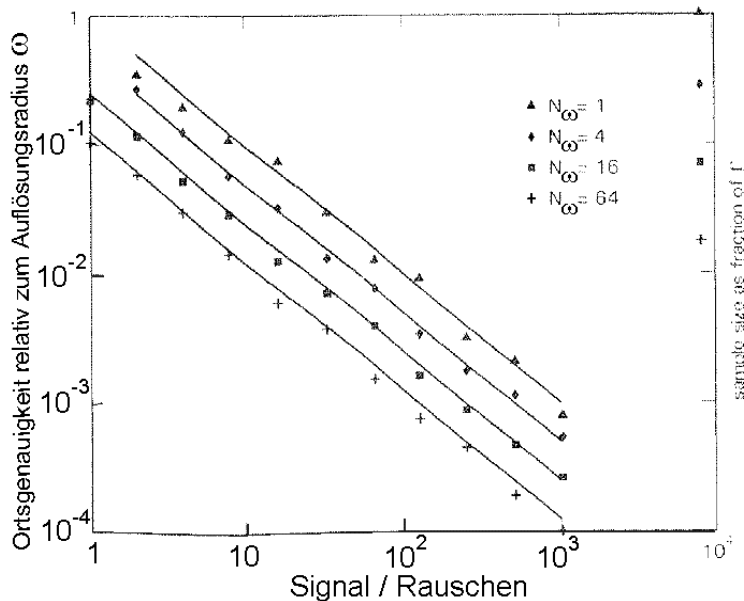


Abbildung 118: Berechnung der verbesserten Positioniergenauigkeit bei einem verbesserten Signal zu Rausch-Verhältnis (aus [Boroff1986]).

N_ω ist die Anzahl der Meßpunkte innerhalb des Gaußradius ω . Nahezu alle in dieser Arbeit aufgenommenen Bilder besitzen ein optisches Auflösungsvermögen mit einem Gaußradius ω von etwa 130 nm und damit eine Punktdichte von etwa $N_\omega = 1.6$ (bei 78 nm Punktabstand). Aus den Daten von Bobroff kann geschlossen werden, daß bereits bei einem schnell aufgenommenen Bild mit einem Signal zu Rausch Verhältnis von nur 5 die Position eines einzelnen Moleküls auf etwa 20 nm bestimmt werden kann. Eine sehr präzise Bestimmung gelingt bei einem sehr hohen Signal zu Rausch Verhältnis. Dazu wird bei einem kleinen Bild mit 64x64 Bildpunkten durch Mittelung über 64 Bildern eine Meßzeit von 131 ms pro Bildpunkt erreicht. Bei einer Signalrate von 500000 Photonen pro Sekunde und einem Untergrund von 3000 Photonen pro Sekunde errechnet sich nach Gleichung

$$\frac{S}{R} = \frac{S}{\sqrt{(S)} + \sqrt{(U)}} \quad (88)$$

für eine Meßzeit von 131 ms ein Signal zu Rausch Verhältnis von 230. Berücksichtigt man, daß mit einem 100x Objektiv an dem Zeiss Mikroskop eine

Meßpunktdichte von $N_\omega = 4$ Pixel pro Gaußradius möglich sind (31,2 nm Pixelabstand), kann nach Abbildung 118 eine Auflösung erreicht werden, die ~ 400 mal kleiner ist als der Gaußradius ω . Aufgrund dieser Abschätzung sollte eine Positioniergenauigkeit von 0.3 nm erreichbar sein. Abbildung 119 zeigt, daß sub nm Auflösung im Experiment tatsächlich möglich ist.

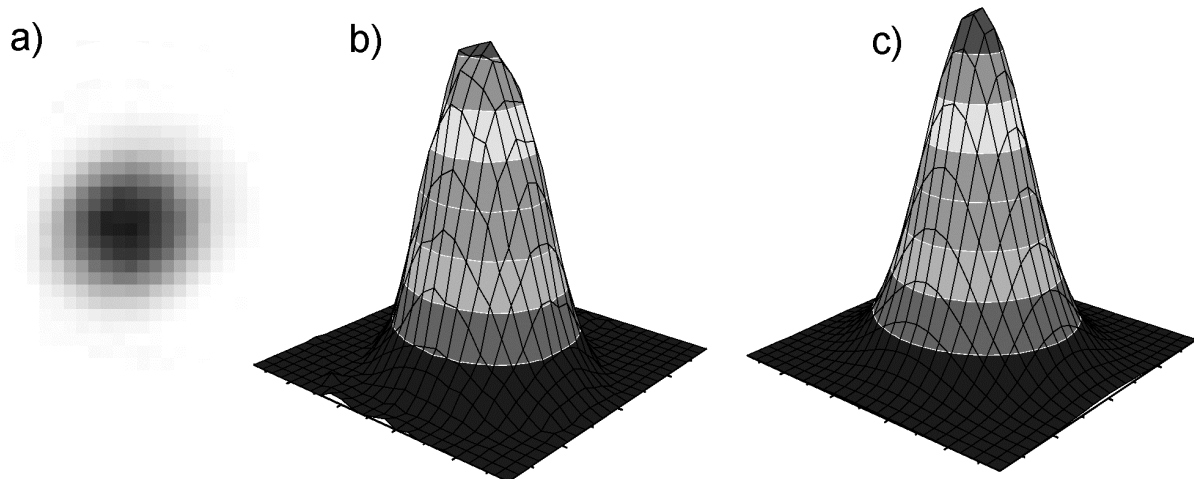


Abbildung 119: Positionsbestimmung eines einzelnen Moleküls. a) Gemessenes Bild, b) Zweidimensionales Intensitätsprofil der Maßdaten, c) Angepaßte Gaußkurve mit einem Fehler in der Positionierung von nur 0.6 nm.

Kurioserweise ist mit 0.6 nm schon eine Positioniergenauigkeit erreicht, die unterhalb der Abmessungen des Farbstoffmoleküls liegt.

Die Parameter der in Abbildung 119 c) angepaßten zweidimensionalen Gaußkurve nach Gleichung (89) sind:

$$Z = A \cdot \left(e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2w_x^2}} e^{-\frac{(y-y_0)^2}{2w_y^2}} \right) + B \quad (89)$$

Parameter	Wert
A	251,51 \pm 1,367 (S/R = 184)
B	2,77 \pm 0,37
x_0	397,90 nm \pm0,63 nm
w_x	117,07 nm \pm 0,72 nm (FWHM = 275 nm)
y_0	395,56 nm \pm0,60 nm
w_y	110,83 nm \pm 0,69 nm (FWHM = 260 nm)
χ^2	39,21853

Berücksichtigt man die Näherung, daß bei der Bildaufnahme in jedem Bildpunkt nur etwa der Bruchteil von $\sim 1/(4 N_\omega)^2$ der gesamten Anzahl der vom Farbstoff emittierten Photonen detektiert wird, so kann aus der Theorie von Bobroff [Bobroff1986]:14a eine Gleichung abgeleitet werden, die aus der gesamten detektierten Photonenanzahl eine Ortsgenauigkeit bestimmt.

$$\frac{(x-\bar{x})}{\omega} \approx 4\sqrt{\frac{N_\omega}{N}} \quad (90)$$

Darin ist N_ω die Meßpunktdichte pro Gaußradius und N die gesamte Photonenzahl. Erstaunlicherweise sinkt die Bestimmbarkeit mit steigender Meßpunktdichte, woraus aber ersichtlich ist, daß die Güte des Signals wichtiger ist als die Auflösung. Abbildung 120 zeigt, wie sich die Ortsbestimmbarkeit durch die Detektion von möglichst vielen Photonen verbessert.

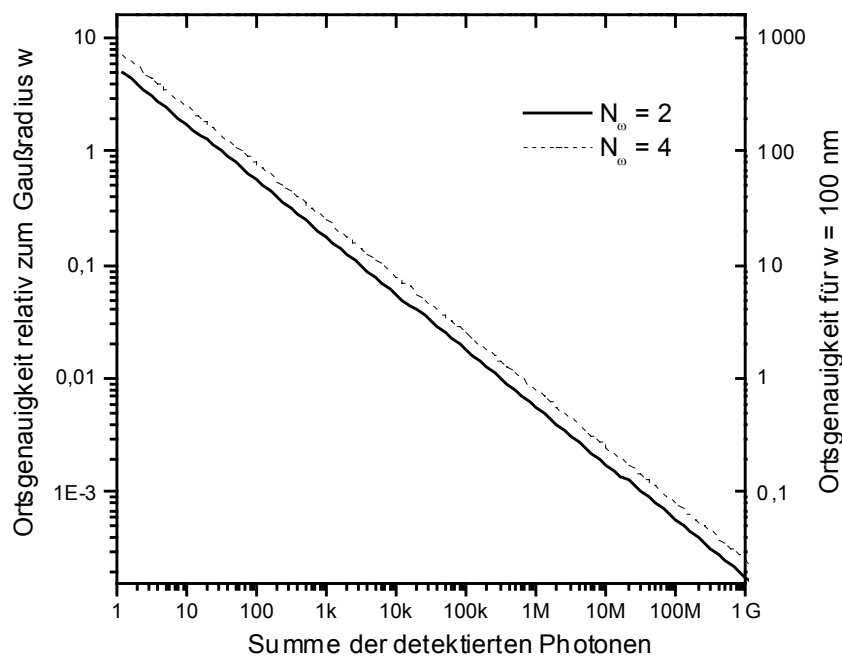


Abbildung 120: Verbesserung der Ortsbestimmbarkeit eines einzelnen Moleküls durch die Detektion vieler Photonen. Die rechte y-Achse gibt die Positioniergenauigkeit für $\omega = 100$ nm an, in diesem Fall entspricht $N_\omega = 2$ einer Meßpunktdichte von 50 nm.

4.3.1.3 3D

Das konfokale Mikroskop bietet die Möglichkeit, den Probenraum dreidimensional abzurastern. Dies ist natürlich auch mit einzelnen Molekülen möglich, die dreidimensional verteilt sind. Bei der Herstellung von dicken PMMA-Proben trat allerdings das Problem auf, daß der Polymerfilm beim Verdunsten des Lösungsmittels stark schrumpft und nach einiger Zeit vom Deckglas abplatzt. Erfolgreicher ist die Verwendung von Oktadekan ($C_{18}H_{38}$) als Matrix. Oktadekan schmilzt bei 28°C und kann TDI in ausreichender Menge lösen. Eine Reihe von Einzelmolekülbildern, die einen $5 \times 5 \times 5$ μm großen Würfel mit $64 \times 64 \times 64$ Punkten in der Probe abrastern, sind in Abbildung 121 dargestellt.

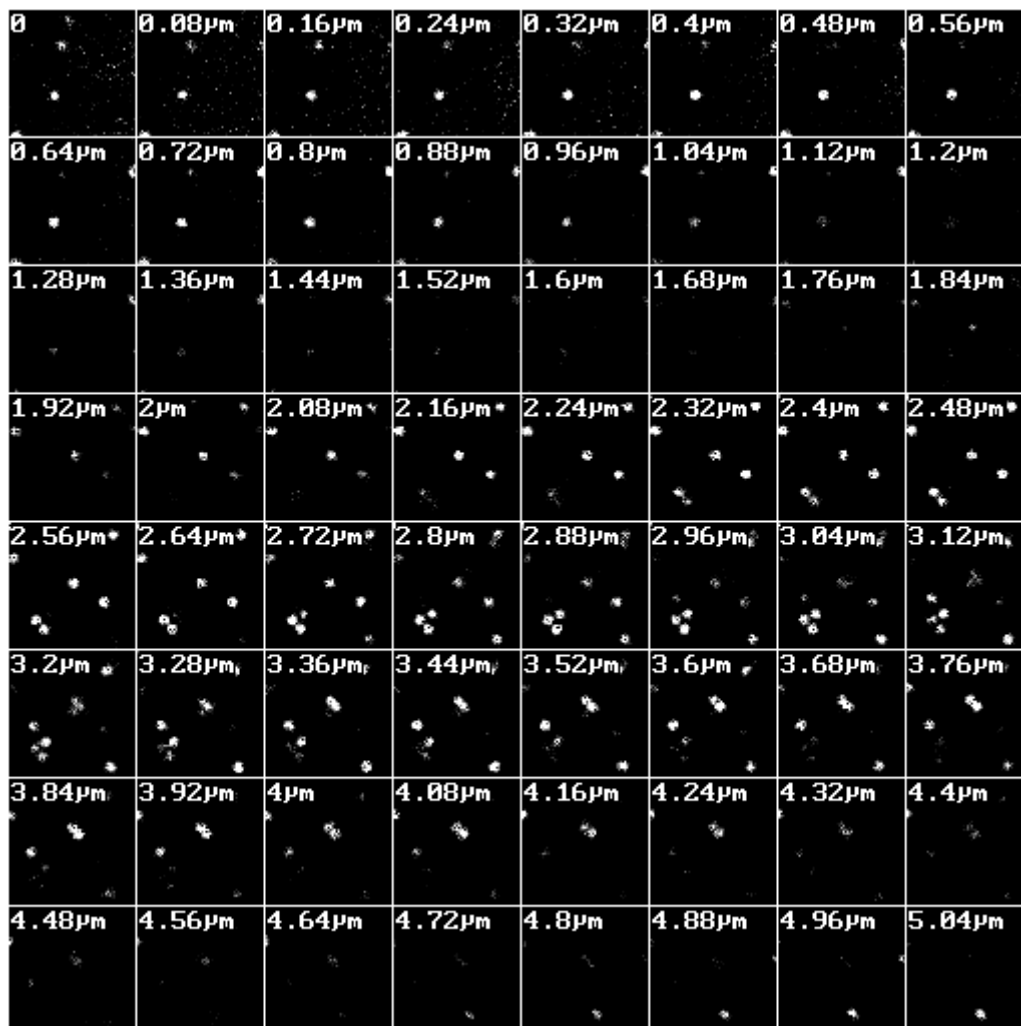


Abbildung 121: Dreidimensionale Aufnahme von einzelnen TDI-Molekülen dargestellt als Abfolge der xy-Bilder mit ansteigendem z-Abstand. Der z-Abstand ist in jedem Bild angegeben. In dem 5x5x5 µm großen Würfel befinden sich etwa 14 einzelne TDI-Moleküle.

Da die Auflösung in der z-Richtung etwa 3 mal schlechter ist als in xy-Richtung, sind die Signale eines einzelnen Moleküls in etwa 12 aufeinanderfolgenden Bildern auszumachen, während in xy-Richtung das Signal nur auf etwa 4 Bildpunkte verteilt ist.

4.3.2 Poröse Festkörper

Die Fluoreszenzintensitäten einzelner Farbstoffmoleküle in porösen Festkörpern sind oft einiges kleiner als in den Referenzproben. Dies kann zum einen an experimentellen Gegebenheiten wie zusätzlichen Grenzflächen und größerem z-Abstand, aber auch an der Probe selbst wie höherer Dynamik oder veränderten spektralen Eigenschaften des Farbstoffes liegen. Um Veränderungen zwischen Proben mit hoher und niedriger Farbstoffbeladung auszuschließen und die optimale Farbstoffkonzentration für Einzelmolekülexperimente zu ermitteln, wurden Proben in verschiedenen Beladungsgraden untersucht.

4.3.2.1 Oxazin / $\text{AlPO}_4\text{-5}$

Die Zugabe von Oxazin Farbstoff zu der Synthese von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ führt zu gleichmäßig fluoreszierenden Kristallen. Abbildung 122 zeigt $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle, denen in der Synthese verschiedene Mengen an Oxazin 1 angeboten wurden.

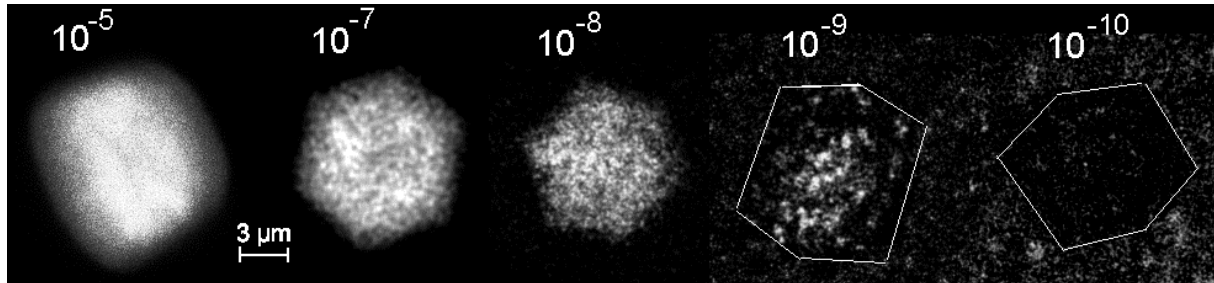


Abbildung 122: Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Die Zahlen geben die angebotene Farbstoffmenge in mmol pro g an. Bei den sehr geringen Konzentrationen sind die Umrisse der Kristalle durch weiße Linien angedeutet. $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$. $I = 11 \mu\text{W}$.

Bei einer Verringerung der Konzentration unter 10^{-8} mmol pro g Ansatz ist keine gleichmäßige Fluoreszenz mehr sichtbar, vielmehr können einzelne Punkte detektiert werden, die als Fluoreszenz von einzelnen Molekülen identifiziert werden kann. Wird die Konzentration weiter verringert, ist schließlich kein einziges Molekül mehr vorhanden und im konfokalen Bild ist nichts mehr zu sehen. Ein ähnliches Verhalten zeigt Abbildung 123, bei der der etwas größere Oxazin 170 Farbstoff eingebaut wurde.

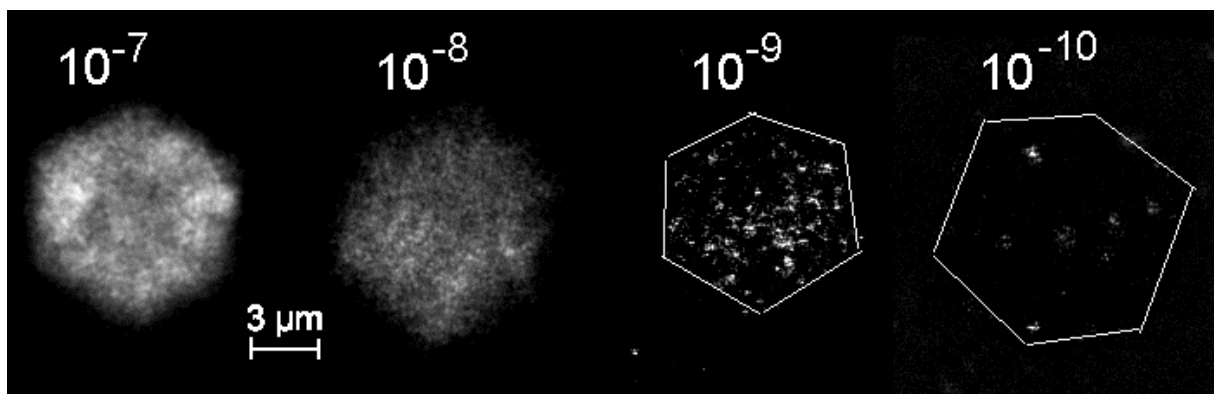


Abbildung 123: Konzentrationsreihe von Oxazin 170 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$, $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$.

Etwas schwieriger wird scheinbar das noch größere Oxazin 750 eingebaut. Abbildung 124 zeigt, daß sich hier schon bei einer angebotenen Menge von 10^{-8} mmol pro g einzelne Moleküle detektieren lassen.

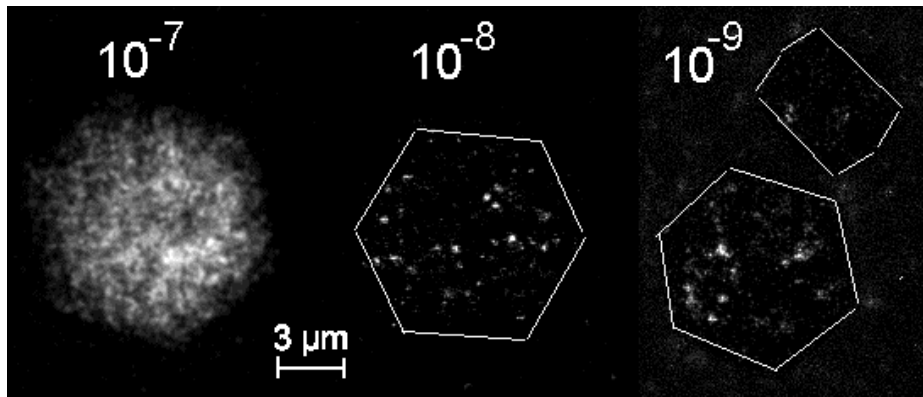


Abbildung 124: Konzentrationsreihe von Oxazin 750 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$, $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$.

4.3.2.2 Cy5 MCM41

Eine weitere Verdünnungsreihe wurde bei der kovalenten Anbindung von Cy5 Farbstoff an die Porenwand von MCM-41 durchgeführt (Siehe Kapitel 3.3.3). Abbildung 125 zeigt, daß hier unterhalb einer Farbstoffkonzentration von $\sim 10^{-9} \text{ mol/g}$ einzelne Farbstoffmoleküle detektiert werden können.

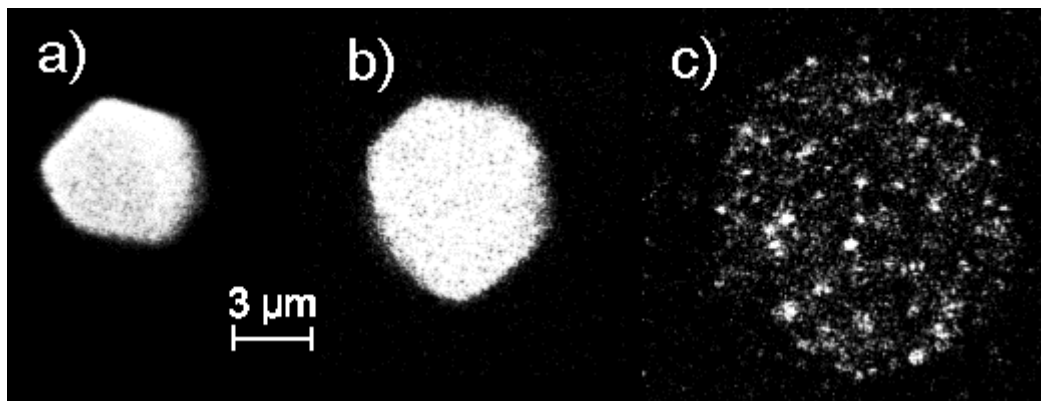


Abbildung 125: Verdünnungsreihe von kovalent an die Pore von MCM-41 angebundenem Cy5. a) $4,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/g}$, b) $9,4 \cdot 10^{-8} \text{ mol/g}$, c) $4,7 \cdot 10^{-10} \text{ mol/g}$.

Bei einer weiteren Probe mit $4,7 \cdot 10^{-12} \text{ mol/g}$ konnte kein Farbstoffmolekül mehr nachgewiesen werden. Die einzelnen Cy5 Moleküle sind aufgrund ihres sehr großen Extinktionskoeffizienten schon bei sehr geringer Anregungsleistung deutlich detektierbar. Die Photostabilität von Cy5 ist aber gegenüber den nur schwach leuchtenden Oxazinen deutlich geringer. Eine Abfolge von Bildern der in Abbildung 125 b) gezeigten Probe soll das starke Bleichverhalten verdeutlichen. In Abbildung 126 sieht man deutlich, wie nach wenigen Bildern der Cy5 Farbstoff so stark gebleicht ist, daß in dem zuvor homogenen Bild Punkte von einzelnen Farbstoffmolekülen sichtbar werden.

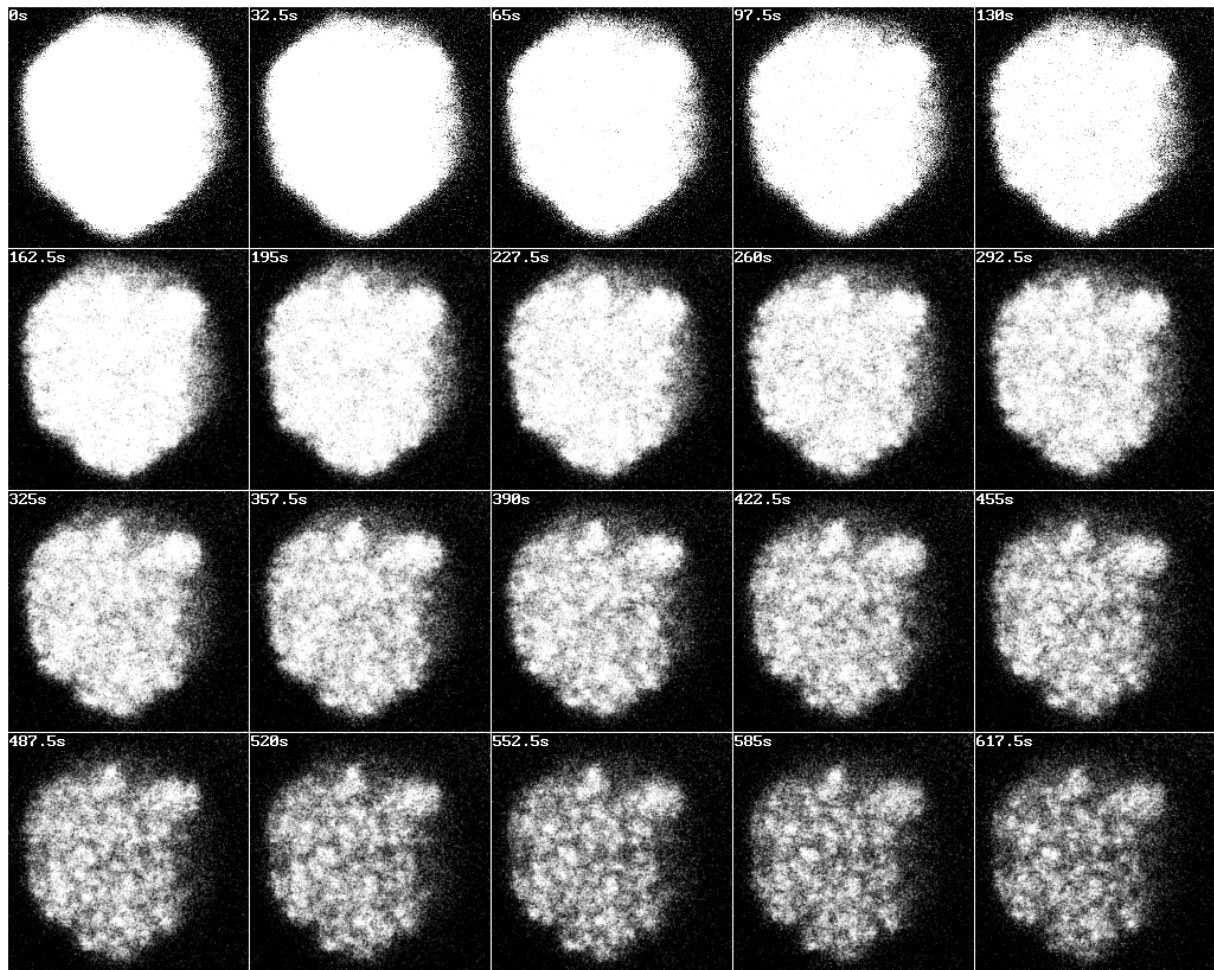


Abbildung 126: Photobleichen von Cy5 in MCM41. Bereits nach der Aufnahme von wenigen Bildern ist nur noch so wenig Farbstoff vorhanden, daß einzelne Moleküle sichtbar werden. ($\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$, $1,2 \mu\text{W}$, $32,5 \text{ s}$ pro Bild, gleiche Probe wie in Abbildung 125 b).

4.3.2.3 TDI Monolith

Durch eine spezielle Synthese mit einer flüssigkristallinen Phase sind mesoporöse M41S Festkörper auch mit sehr großen Abmessungen darstellbar (siehe Kapitel 3.2.4). Zur Synthese des M41S Monoliths wurde in den Flüssigkristall (OMO) der Farbstoff TDI zugegeben. Abbildung 127 zeigt, daß in dieser Probe die zugegebene Farbstoffkonzentration kaum einen Einfluß auf die anschließend im M41S Monolith vorhandene Menge hat. Hohe Farbstoffkonzentrationen sind daher nicht erreichbar. Die Löslichkeit von TDI im Flüssigkristall ist so gering, daß der Farbstoff nicht mehr gelöst werden kann und ausfällt. Hin und wieder ist auch schon ein extrem stark fluoreszierendes kleines Stück gesichtet worden, das wohl ausgefallenes TDI ist.

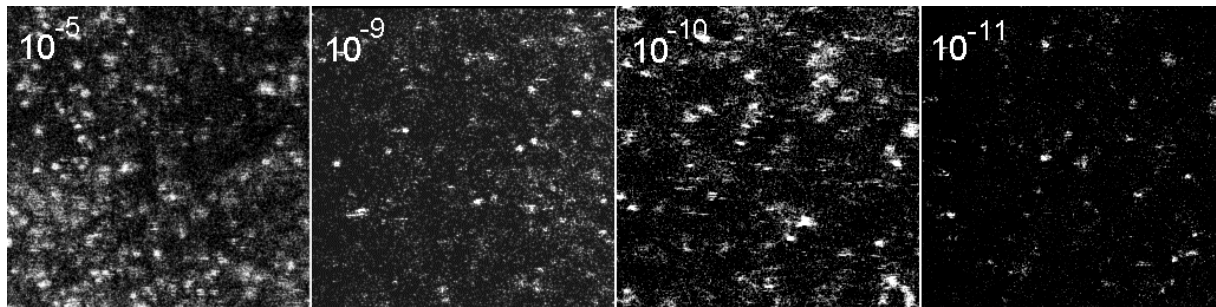


Abbildung 127: Verdünnungsreihe von TDI in M41S-Monolith. Die Zahlen geben die zur Synthese zugegebene Farbstoffkonzentration in mol/L an. (0,1 mL werden zugegeben, ~2 g Monolith werden erhalten)

In den konfokalen Fluoreszenzbildern fällt auf, daß vereinzelt die Einzelmoleküle nicht als runder Punkt, sondern als horizontaler Strich abgebildet werden (siehe z.B. Abbildung 127: 10^{-10} Bildmitte). Die Beobachtung von abgeschnittenen Punkten kann auf zwei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen kann das Farbstoffmolekül dynamische Prozesse besitzen, die das Fluoreszenzsignal modulieren (Blinken, Triplettzustände), zum anderen kann das Molekül diffundieren und wird nur während der Aufnahme einer Zeile vom konfokalen Meßpunkt erfaßt. Hier tritt Diffusion auf, die im 'Dynamik' Kapitel 4.4.7 behandelt wird.

4.3.2.4 TDI in UTD-1

In große Nadeln des kalzinierten und extrahierten Porosil UTD-1 kann TDI aus der Lösung in das Innere des Kristalls eindiffundieren (siehe Kapitel 4.2.2). Wird der Kristall anschließend gründlich gewaschen, bleibt im Inneren etwas Farbstoff zurück. Abbildung 128 a) zeigt, daß nach dem Waschen einige Farbstoffmoleküle nicht ausgewaschen werden, jedoch sind immer noch zu viele Moleküle vorhanden, um die einzelnen Fluoreszenzpunkte sicher zu trennen.

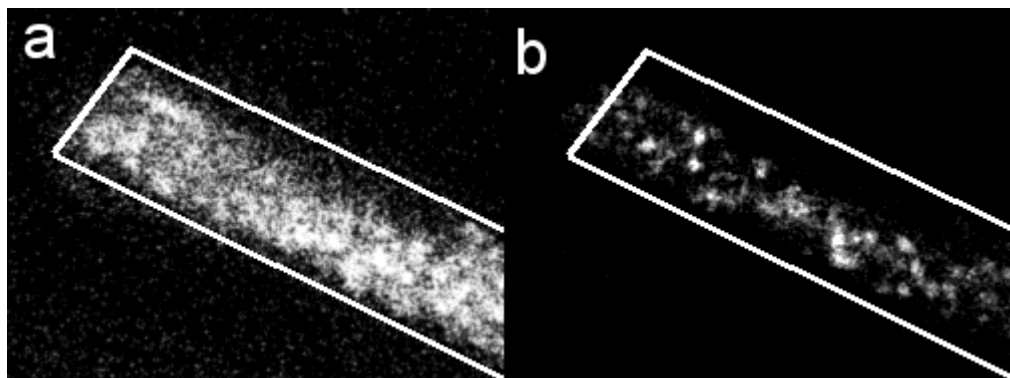


Abbildung 128: Einzelne TDI Moleküle in UTD-1 a) Nach der Beladung durch Eindiffusion und anschließendem mehrmaligem Waschen mit CHCl_3 b) Nach anschließendem Ausbleichen von instabilen Molekülen und Untergrund.

Um die Konzentration weiter zu verringern, wird der Kristall etwa 1 Stunde bestrahlt. In dem anschließend erhaltenen Bild sind einzelne TDI Farbstoffmoleküle sehr gut detektierbar. Neben der Verringerung der TDI Konzentration hat der Bleichvorgang auch den unstrukturiert strahlenden Untergrund reduziert.

Zusammenfassend zeigen diese Messungen, daß in einigen Proben einzelne Punkte detektiert werden können, bei denen es sich um einzelne Farbstoffmoleküle handelt. Der korrekte Nachweis für einzelne Moleküle erfolgt eigentlich erst durch digitales Photobleichen in den folgenden Kapiteln.

4.4 Dynamische Intensitätsmessungen an einzelnen Molekülen

In diesem Kapitel werden zeitliche Änderungen im Fluoreszenzverhalten einzelner Moleküle behandelt. Die Meßmöglichkeiten überspannen dabei einen Zeitbereich, der über 12 Größenordnungen reicht: Von der Fluoreszenzlebensdauer im ns Bereich bis hin zum digitalen Bleichen nach mehreren tausend Sekunden. Zwischen diesen beiden Extremen liegen Intensitätsfluktuationen, die durch Tripletzustände, Dunkelzustände und Diffusion begründet werden.

4.4.1 Kurzzeit

Durch die Technik des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen (TCSPC) kann unter Verwendung einer gepulsten Laserquelle die Fluoreszenzlebensdauer gemessen werden (siehe Kapitel 2.6.2.4). Als Lichtquelle wird hier ein modengekoppelter und anschließend frequenzverdoppelter YLF-Laser verwendet, der im Zeitabstand von 12 ns etwa 100 ps lange Lichtpulse mit einer Wellenlänge von 527 nm liefert. Es werden die Fluoreszenzlebensdauern von verschiedenen Farbstoffen (Rhodamin 6G, Terrylen, Styryl 8, Stilbenderivat) in dünnen PMMA Filmen bestimmt [Lançon1999] (siehe Abbildung 116). Alle untersuchten Farbstoffe erwiesen sich nicht als besonders photostabil. Die TCSPC Messung wird für jedes einzelne Molekül nur jeweils so lange durchgeführt, bis ein plötzliches Abfallen der Fluoreszenzrate beobachtet wird. Da die meisten Farbstoffmoleküle bei den Messungen nur wenige Sekunden detektiert werden, sind nur wenige zuverlässige Meßpunkte vorhanden. Abbildung 129 zeigt eine Fluoreszenzzerfallskurve von Terrylen. Da die Zeitauflösung der SAPD nur etwa 600 ps beträgt (IRF: Instrument response function, Zeitauflösung der Messung) entspricht die Meßkurve zu Beginn nicht der erwarteten Exponentialfunktion. Um dieses Problem zu lösen, muß entweder die Messung mit der IRF in der Anpassungsroutine entfaltet werden oder, wenn die Zerfallszeit viel größer als die IRF ist, wird nur der hintere Teil der Meßkurve ausgewertet. Der Beginn der Anpassung wird dann mindestens eine Nanosekunde hinter das Maximum der Kurve gelegt. Für eine multiexponentielle Anpassung ist in der Regel die Entfaltung durchzuführen.

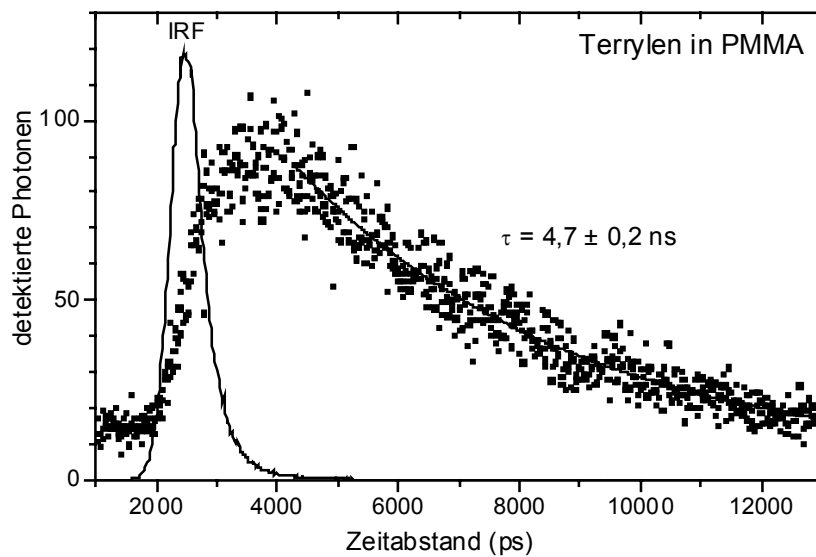


Abbildung 129: Fluoreszenzzerfallskurve eines einzelnen Terrylen Moleküls in PMMA. Die Zeitauflösung der Messung beträgt etwa 600 ps.

Messungen an einzelnen Rhodamin 6G Molekülen zeigen eine starke Streuung der Zerfallszeiten. Abbildung 130 zeigt drei von sechs erfolgreichen Lebensdauermessungen.

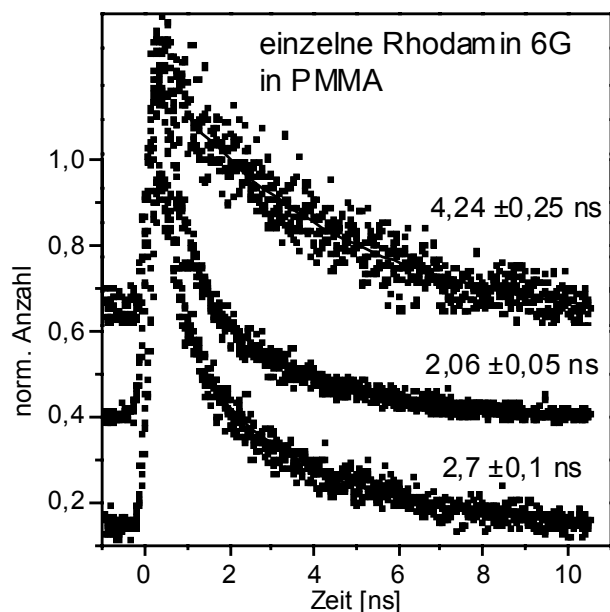


Abbildung 130: Starke Streuung der Fluoreszenzzerfallszeiten von Rhodamin 6G in PMMA.

Der anfängliche Verlauf der Kurven wird zum Teil sehr stark von der IRF geprägt. Das Licht, das hier detektiert wird, kann von der Ramanstreuung oder von nicht ausreichender Blockung der Fluoreszenzfilter stammen. Der hintere Teil der Meßkurven kann jedoch gut mit einer Exponentialkurve angepaßt werden. Bei einer höher konzentrierten Probe sind etwa 10 Moleküle in konfokalen Volumen

vorhanden, wodurch die Streuung schon viel geringer wird. Abbildung 131 zeigt wie sich die Streuung der gemessenen Zerfallszeiten mit der Zahl der gemessenen Moleküle verringert.

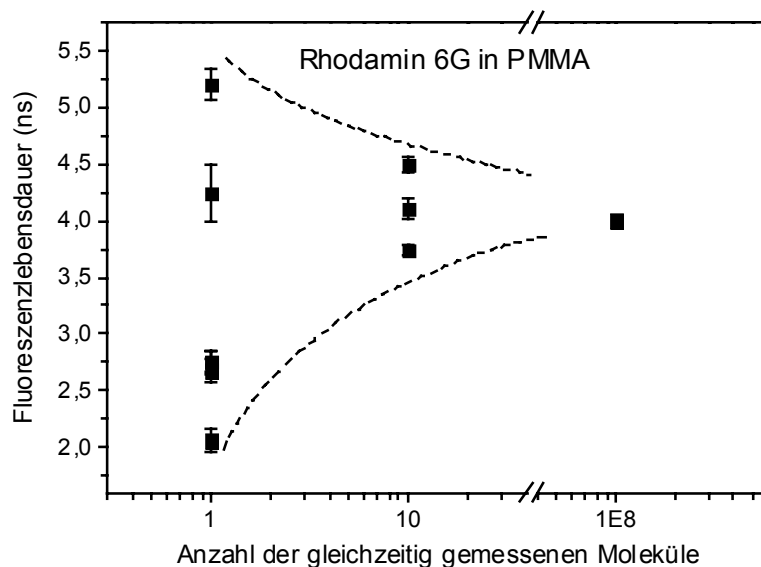


Abbildung 131: Nur bei der Messung einzelner Moleküle wird eine sehr starke Streuung der Fluoreszenzzerfallszeiten beobachtet. Je mehr Moleküle gleichzeitig beobachtet werden, desto näher liegen die Zeiten am Wert für viele Moleküle (4 ns). Die eingezeichneten Linien wurden nicht berechnet, sondern sollen nur den Trend verdeutlichen.

Im Grenzfall für sehr viele Moleküle wird eine Zerfallszeit von 4 ns beobachtet. Der Literaturwert für Rhodamin 6G in Wasser beträgt 3,9 ns [Eggeling1998b].

Zusammenfassend wird hier deutlich gezeigt, daß die Fluoreszenzlebensdauer einzelner Moleküle im Festkörper sehr stark variieren kann.

4.4.2 Triplett aus Zeitspuren

Dynamische Änderungen der Fluoreszenzintensität bei längeren Zeiten sind direkt aus dem Signal der Avalanche-Photodiode detektierbar. Dazu wird das konfokale Meßvolumen genau auf das zu beobachtende einzelne Molekül gesetzt ('spot -scan') und der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz aufgenommen. Abbildung 132 zeigt eine derartige Zeitspur, die von einem einzelnen TDI Molekül gemessen wurde.

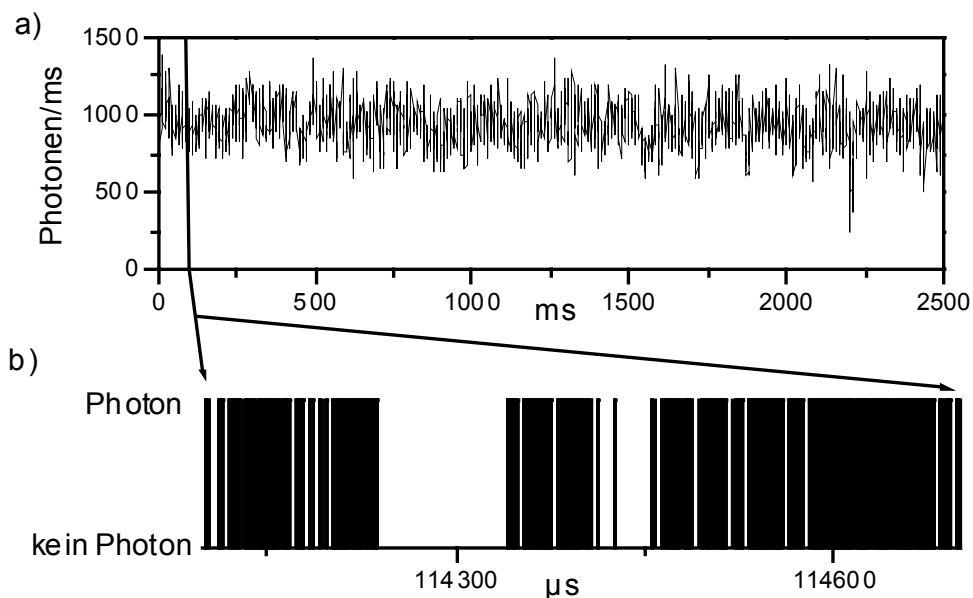


Abbildung 132: Fluoreszenzzeitspur von TDI. a) Typischer Verlauf bei ms Auflösung, b) Hocho aufgelöst kann man die Ankunftszeit jedes detektierten Photons bestimmen. Die An-Aus Dynamik in b) ist auf die Besetzung des Triplettzustandes zurückzuführen.

Betrachtet man die Zeitspur genauer, so beobachtet man eine An-Aus Dynamik auf der μs Zeitskala. Diese Dynamik kann der Besetzung des Triplettzustandes zugeordnet werden. Zu beachten ist hierbei, daß das Datenaufkommen dieser Messung enorm ist. Ein TDI Molekül, das mit einer mittleren Zählrate von 1 Mio. detektierten Photonen pro Sekunde 100 Sekunden lange beobachtet wird, produziert in dieser Zeit 100 Mio. Datenpunkte, die gespeichert und verarbeitet werden müssen. Um den Triplettzustand zu charakterisieren, wird ein Histogramm über alle Photonenabstände berechnet. Dieses Histogramm enthält zwei charakteristische Zeiten: Die Triplett-Auszeit, während der das Molekül sich im Triplettzustand befand und die Poisson-Auszeit, die den mittleren Abstand der Photonen in der Anzeit aufgrund der Poisson Statistik angibt. Abbildung 133 zeigt ein typisches Auszeitenhistogramm von TDI bei hoher Anregungsleistung.

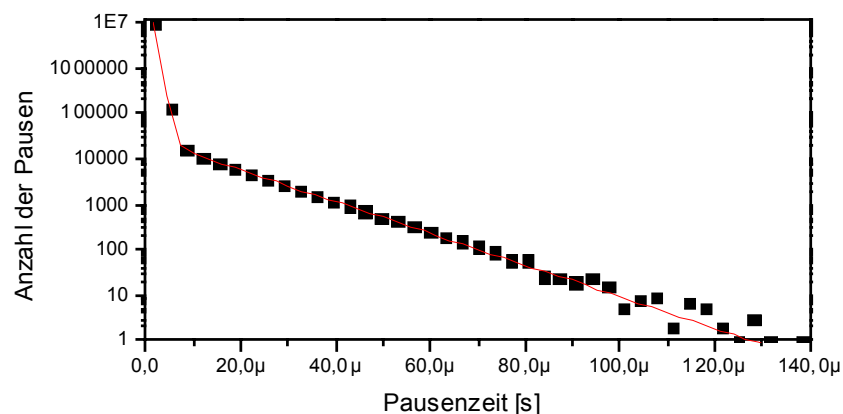


Abbildung 133: Auszeitenhistogramm von TDI bei einer Anregungsleistung von 35 μW .

An diesem Molekül wurden auch die hochaufgelösten Zeitspuren bei 1/10 und 1/100 der maximalen Anregungsleistung aufgezeichnet. Die Auswertung der Pausenzeiten ist in Abbildung 134 dargestellt.

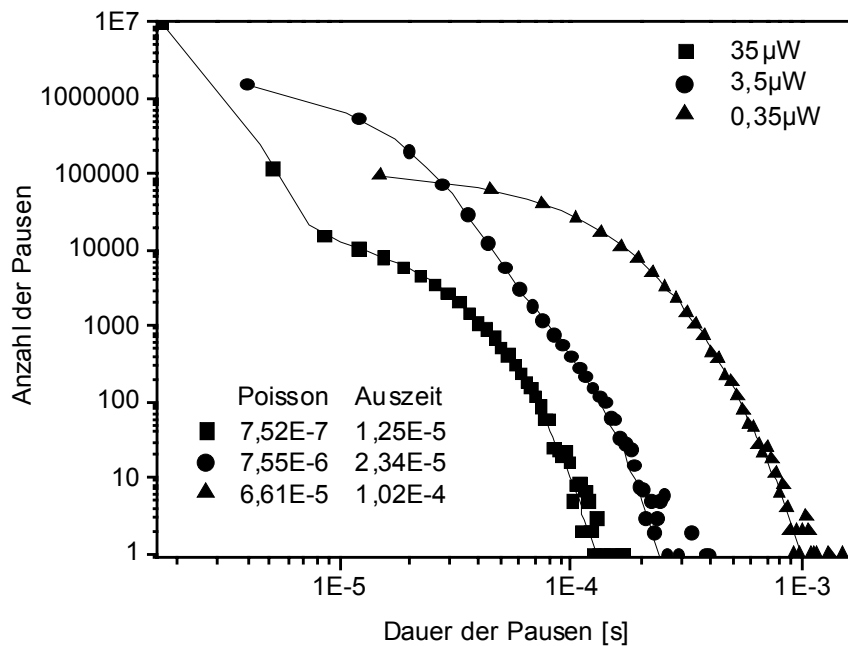


Abbildung 134: Histogramm der Photonenabstände eines einzelnen TDI-Moleküls bei drei verschiedenen Anregungsleistungen. Die Daten werden zur Analyse der Poisson- und Auszeiten mit zwei Exponentialfunktionen angepaßt.

Zur Analyse der Poisson- und Auszeiten werden die Histogramme mit biexponentiellen Kurven angepaßt. Bei den hohen Anregungsleistungen liegen die beiden Zeiten noch weit auseinander und können daher sehr gut getrennt werden. Bei der geringsten Anregungsleistung liegen die Zeiten nur noch eine Größenordnung auseinander und können daher gerade noch getrennt werden.

Etwas schwieriger und ungenauer ist die Analyse der An-Phasen des Moleküls. Hier wird ausgehend von der zuvor bestimmten Poissonzeit ein Schwellenwert gesetzt, unterhalb dem sich das Molekül ständig in seinem An-Zustand befindet. In der Praxis hat sich dafür die 4fache Poissonzeit bewährt, um mit hoher Sicherheit die nächste Auszeit zu erkennen. Abbildung 135 zeigt das Histogramm der mit diesem Kriterium bestimmten An-Phasen.

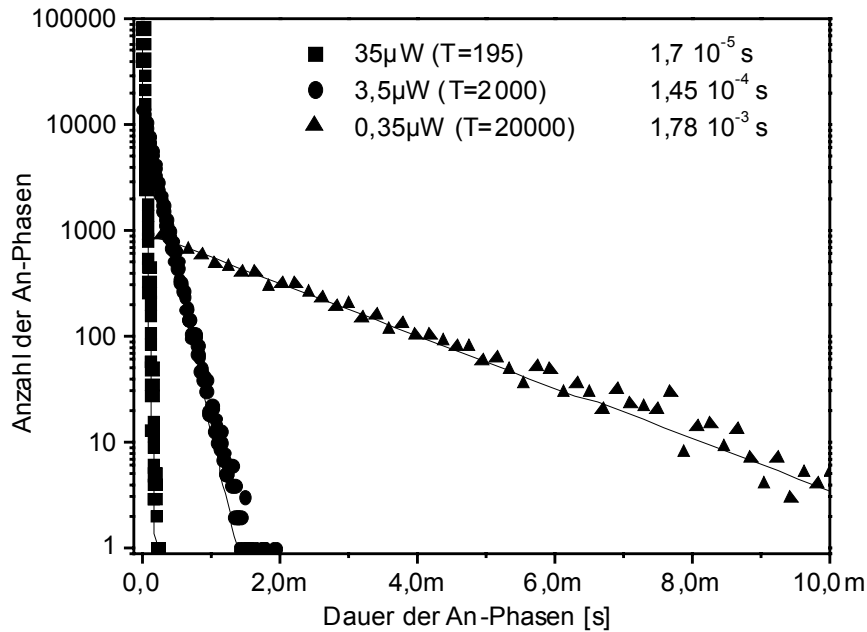


Abbildung 135: Histogramm der Anzeiten eines TDI-Moleküls bei drei verschiedenen Anregungsleistungen.

Durch eine exponentielle Anpassung der Histogramme wird die mittlere Anzeit bei der entsprechenden Anregungsleistung bestimmt.

Zwischen den gemessenen Zeiten und den realen An- und Auszuständen des Moleküls ist ein geringer Unterschied, der in Abbildung 136 skizziert wird, zu berücksichtigen.

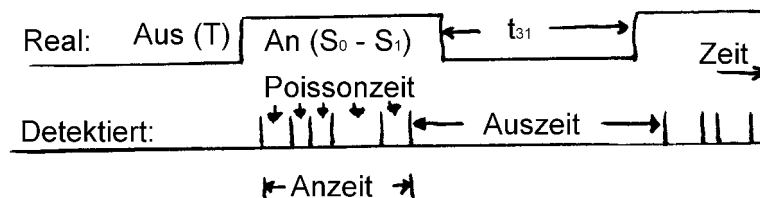


Abbildung 136: Skizze der Zeitspuren des Moleküls und der detektierten Photonen. Zu beachten ist z.B., daß die Auszeit nicht exakt t_{31} entspricht.

Nachdem das letzte Photon einer Anphase detektiert wird, ist das Molekül noch einige Zeit im An-Zustand. Diese Zeitverschiebung entspricht genau einer halben Poissonzeit. Bei der Bestimmung der t_{31} -Zeit muß daher von der gemessenen Auszeit noch die Poissonzeit abgezogen werden. Ebenso muß zur gemessenen Anzeit eine Poissonzeit addiert werden. Die so bestimmten t_{31} Zeiten sind in Abbildung 137 oben dargestellt.

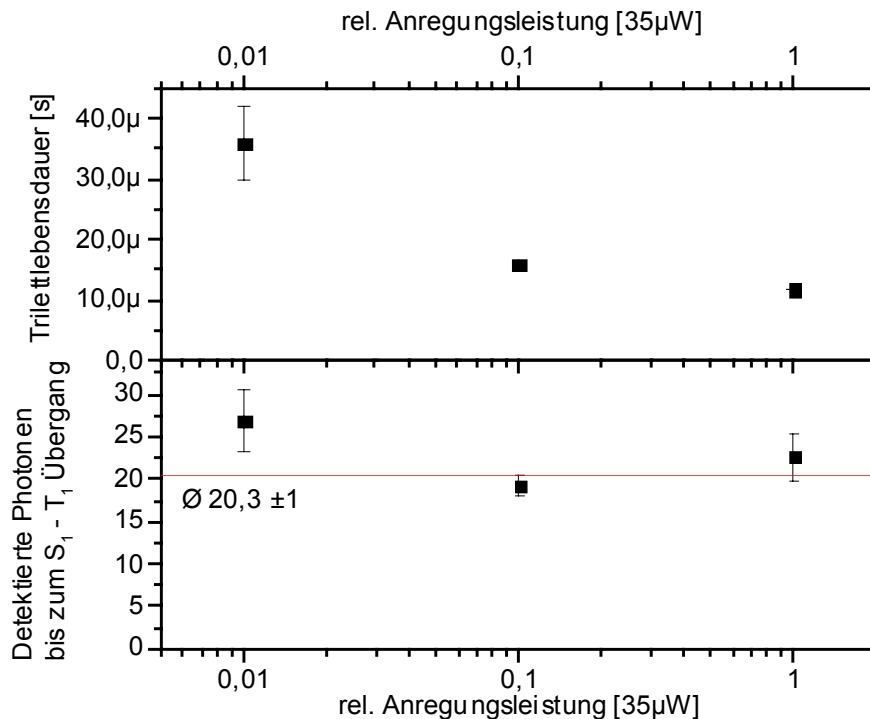


Abbildung 137: Leistungsabhängige Bestimmung der Triplettlebensdauer (oben) und der detektierten Photonenzahl bis zum Tripletübergang (unten) eines TDI-Moleküls.

Man kann hier erkennen, daß dabei die Triplettlebensdauer nicht wie erwartet konstant bleibt ($k_{31} \sim 10^5$). Bei höheren Anregungsleistungen sinkt die Triplettlebensdauer etwas ab. Vermutlich gibt es einen lichtabhängigen Weg vom Triplettsystem zurück zum Singulettssystem. Dieser Prozeß könnte über einen höheren Tripletzustand ($T_1 - T_N - S_1$) erfolgen [English2000] [Fleury2000]. Aus der Poissonzeit und der mittleren Anzeit kann schließlich noch die mittlere detektierte Photonenzahl bis zum Tripletübergang bestimmt werden (siehe Abbildung 137 unten). Berücksichtigt man zusätzlich noch die Detektionseffizienz des Mikroskops von etwa 3%, so kann die Anzahl der S_0 - S_1 Photocyclen zu ~ 700 abgeschätzt werden. Bei einer abgeschätzten Fluoreszenzlebensdauer von 3,5 ns ergibt sich hier eine Intersystemcrossingrate von $k_{23} = 4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$. Im Vergleich zu den im nächsten Kapitel mittels FCS bestimmten Raten besitzt das hier untersuchte Molekül ungewöhnlich hohe Tripletttraten.

4.4.3 Triplet aus FCS

Eine drastische Reduzierung der Datenmenge wird mit einer statistischen Analyse der Intensitätsfluktuationen über die gesamte Meßzeit erreicht. Dazu wird die Autokorrelationsfunktion aus dem Fluoreszenzsignal berechnet (Fluorescence correlation spectroscopy - FCS). Eine Computerkarte (ALV5000) kann direkt aus dem elektrischen Signal der SAPD die Korrelationsfunktion berechnen. Bei der Berechnung der Autokorrelationsfunktion geht jedoch die Information, zu welchem Zeitpunkt eine Intensitätsänderung stattfand, verloren d.h. die Dynamik in der Dynamik. Zur Analyse von Tripletttraten und Diffusionskonstanten ist die Fluoreszenz-korrelationsanalyse jedoch sehr gut geeignet.

Als Modellsystem für eine Untersuchung des Triplettzustandes wurde wiederum TDI in PMMA ausgewählt. Die Probe wurde an der Luft versiegelt und enthält daher sicher Sauerstoff, der den Triplettzustand quenchen kann. Jedoch wurden auch an einer mit Stickstoff gespülten Probe keine Unterschiede festgestellt. Bei der Untersuchung der Photostabilität des Farbstoffes wurden über 40 Messungen an immobilisierten Molekülen durchgeführt, die gleichzeitig die Autokorrelationsfunktion enthielten. Ein Beispiel dieser Messungen ist in Abbildung 138 dargestellt.

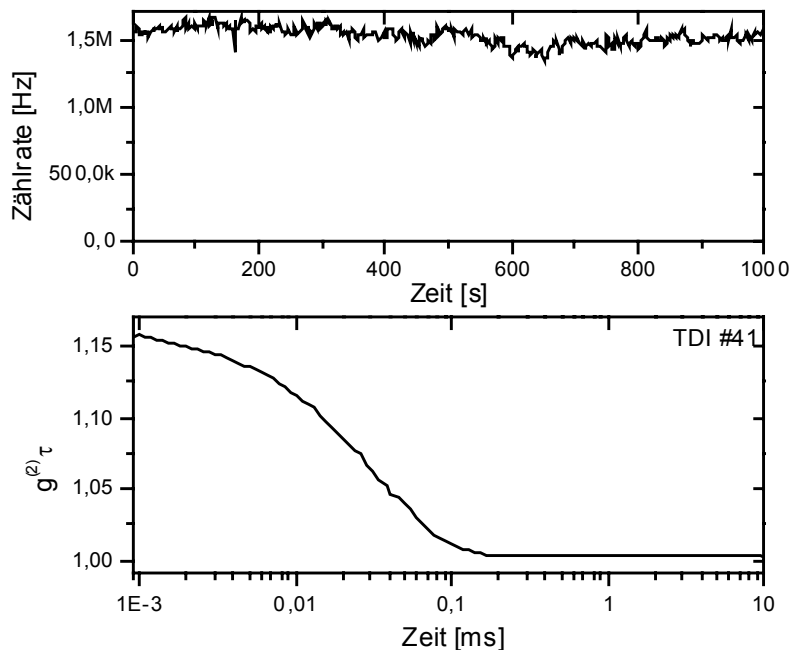


Abbildung 138: Intensitätsverlauf und Fluoreszenzautokorrelationsfunktion eines einzelnen immobilisierten TDI-Moleküls.

Die Auswertung der FCS Daten erfolgt mit der in Kapitel 2.6.2.2.2 beschriebenen Methode. Aus dem Kontrast und der Zerfallsrate kann dabei direkt die Triplettzerfallsrate k_{31} berechnet werden (siehe Formel (56)). Abbildung 139 zeigt, daß mindestens zwei verschiedene Raten k_{31} auftreten können (16000 s^{-1} und 28000 s^{-1}). Obwohl von etwa 10 Molekülen mehrere Messungen vorliegen, konnte in keinem Fall ein Wechsel zwischen beiden Raten gefunden werden. Da es sich aber um identische chemische Verbindungen handelt, muß wohl das umgebene Polymer mindestens zwei verschiedenen Einbaulagen oder Konformationen zur Verfügung stellen.

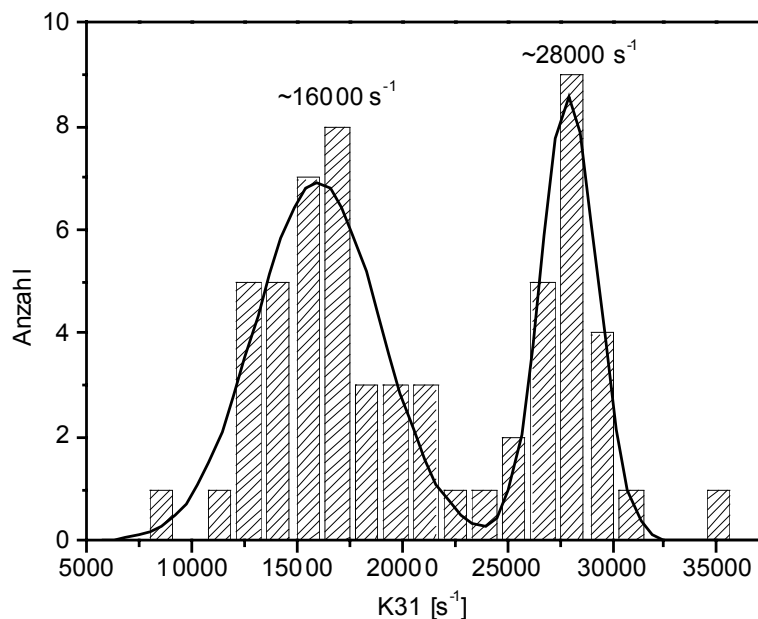


Abbildung 139: Histogramm von TDI Tripletzerfallsraten in PMMA. Mindestens zwei verschiedene mittlere Raten (16000 s^{-1} und 28000 s^{-1}) werden gefunden. Zwei entsprechende Gaußverteilungen können gut an die Raten angepaßt werden.

Auch die Intersystemcrossing Rate K23 kann aus den FCS Daten erhalten werden. Um einen absoluten Wert zu erhalten, ist jedoch eine Abschätzung der Anregungsrate nötig, die hier als das 30 fache der Detektionsrate, die für jedes Molekül mitgemessen wurde, abgeschätzt wird (siehe Kapitel 2.6.2.2.2). Ein grober Fehler in dieser Abschätzung verändert zwar den absoluten Wert, nicht aber die relative Verteilung der ermittelten k23 Raten. Abbildung 140 zeigt, daß hier nur eine breite Verteilung von Raten gefunden wird, bei der keine Heterogenität aufgelöst werden kann.

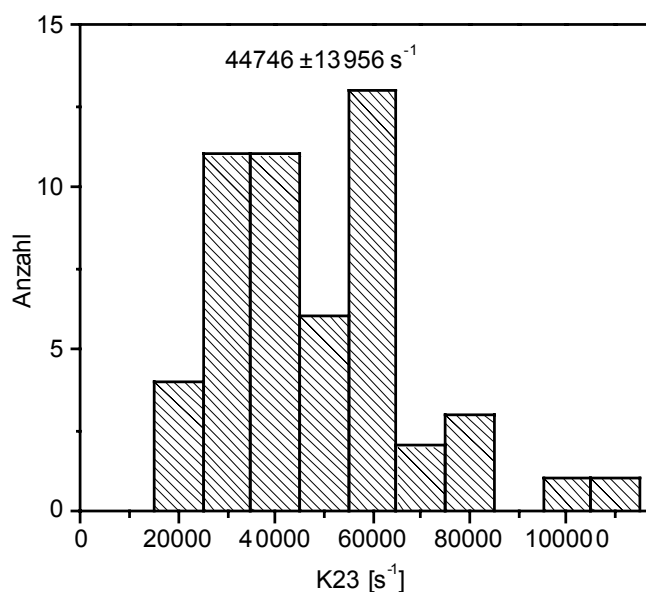


Abbildung 140: Histogramm von TDI Intersystemcrossingraten k23 in PMMA.

Neben der Triplettedynamik und dem irreversiblen Photobleichen konnte bei diesen Messungen keine andere Intensitätsdynamik an TDI in PMMA beobachtet werden. Dies ist insbesondere deshalb verwunderlich, als bei den in Kapitel 4.8.2 gemessenen Spektren im Abstand von wenigen ms durchaus Änderungen beobachtet wurden. Entweder sind die über die Spektren beobachteten Änderungen nicht oder nur schwach mit einer Intensitätsänderungen verbunden oder sie sind zu selten und unregelmäßig, als daß sie mit FCS detektiert werden konnten.

Es könnte die Vermutung aufkommen, daß diejenigen Farbstoffmoleküle besonders photostabil sind, die selten den Triplettzustand besetzten (niedrige k_{23} Rate) oder schnell bzw. langsam wieder aus dem Triplett zerfallen. Wie aber aus der Korrelation in Abbildung 141 hervorgeht, wurde kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Photostabilität und den verschiedenen Tripletttraten gefunden. Auch zwischen den Tripletttraten k_{23} und k_{31} wird keine Korrelation gefunden.

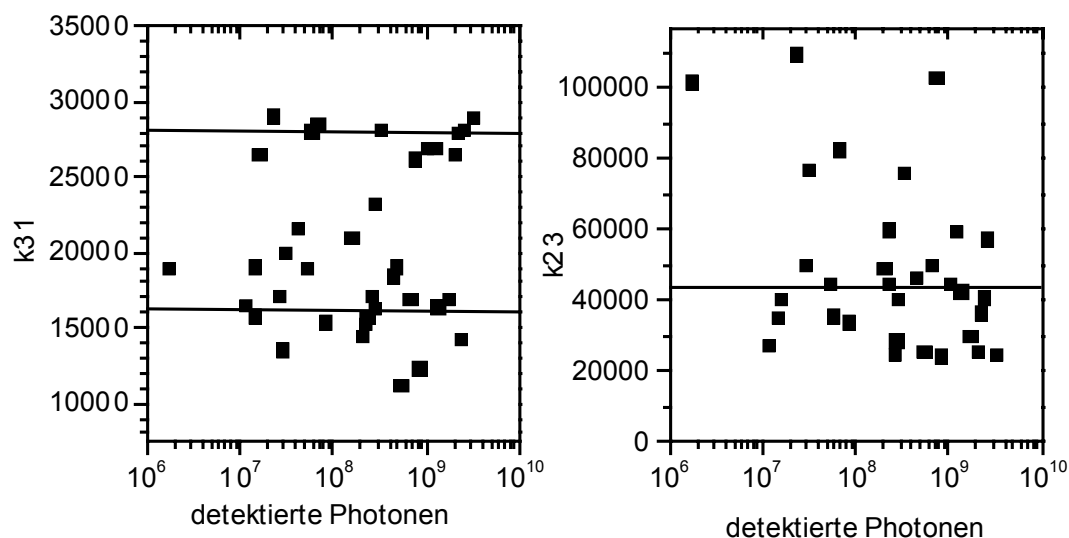


Abbildung 141: Keine Abhängigkeit zwischen Photostabilität und Tripletttraten k_{31} und k_{23} der einzelnen TDI Moleküle. Die gefundenen mittleren Raten sind als horizontale Linie eingezeichnet.

Neben dem Molekül TDI wurden die Tripletttraten auch an Cy5 und Oxazin 1 in PMMA bestimmt. Folgende Tabelle gibt eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse:

Farbstoff in PMMA	k_{31}	k_{23}
Cy5	24000 s^{-1}	54000 s^{-1}
Oxazin 1	26000 s^{-1}	70000 s^{-1}

4.4.3.1 Oxazin 170 in $\text{ALPO}_4\text{-5}$

An den zeolithgekapselten Farbstoffen ist eine Messung an einem in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ eingelagerten Oxazin 170 Molekül durchgeführt worden, das eine ungewöhnlich hohe Photostabilität besaß. Entgegen dem schnellen Photobleichen der anderen gemessenen Oxazin 170 Moleküle (ca. 100 Stück) in wenigen Sekunden, konnten an diesem Molekül über 20 Minuten Experimente durchgeführt werden, bis es verschied.

Abbildung 142 zeigt die leistungsabhängigen FCS Kurven aus denen sich die Tripletraten sehr gut bestimmen lassen.

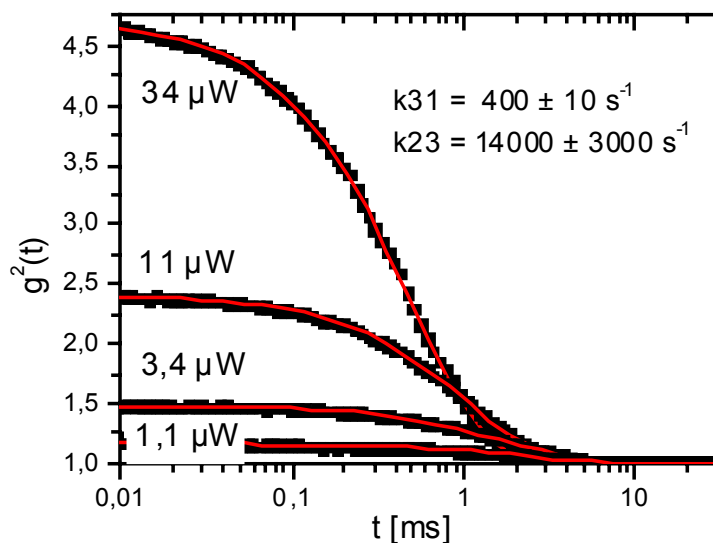


Abbildung 142: FCS Kurven von Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. An diesem ungewöhnlich photostabilen Molekül konnten die Tripletraten sehr genau bestimmt werden ($k_{31} = 400 \pm 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{23} = 14000 \pm 3000 \text{ s}^{-1}$).

Die Auswertung wurde wie in Kapitel 2.6.2.2 beschrieben durchgeführt. Die für die Bestimmung von k_{23} nötige Anregungsrate w kann aus den leistungsabhängigen Messungen gewonnen werden. Hier ergibt sich eine Anregungsrate von $2.1 \pm 0.4 \cdot 10^6$ pro μW Anregungslicht. Eine Bestimmung aus den molekularen Daten mit Formel (61) mit $\sigma(633\text{nm}) = 2,4 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$, $\text{NA} = 1.3$) ergibt einen ähnlichen Werte von $2.2 \pm 1 \cdot 10^6$ pro μW Anregungslicht. Auffallend ist die relativ geringe Tripletrate k_{31} von 400 s^{-1} . Dies deutet darauf hin, daß kein Triplettquenscher wie z.B. Sauerstoff in der Nähe des Farbstoffs vorhanden ist. Da der in PMMA eingebettete $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall aber an Luft gemessen wurde, muß der Farbstoff vermutlich in einer Sauerstofffreien und diffusionsdichten Stelle im Kristall gelegen haben. Diese Stellen sind aber wohl sehr selten, da von etwa 100 untersuchten Molekülen nur eines dieses extrem photostabile Verhalten zeigte.

4.4.4 Bleichen

Durch das abrupte Ende einer Fluoreszenzspur besitzt jedes Farbstoffmolekül eine irreversible Bleichrate k_B . Diese Bleichrate beschreibt den Weg vom angeregten Zustand in den geblichenen Zustand. Auch wenn schon von einigen Farbstoffmolekülen 10^{10} Photozyklen beobachtet wurden, irgendwann konnte bisher jedes untersuchte Molekül geblichen werden. Die Beobachtung des abrupten Bleichens ist unbedingt am Ende jeder Messung nötig, da dies oft die einzige Möglichkeit ist, irrtümliche Meßdaten von zwei oder mehreren Molekülen auszuschließen. Die Bleichspur eines sehr hellen TDI Moleküls ist in Abbildung 143 abgebildet.

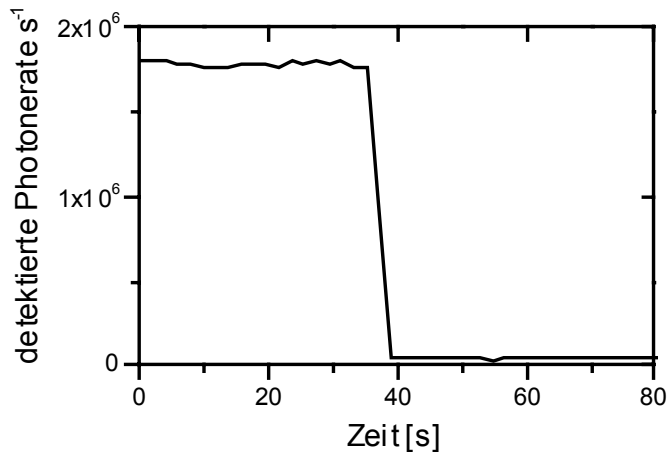


Abbildung 143: Abruptes Bleichen eines einzelnen TDI Farbstoffmoleküls mit einer Detektionsrate von $\sim 1,8$ MHz nach ca. 40 s. Von diesem Molekül wurden etwa 70 Mio. Fluoreszenzphotonen detektiert.

Die gezielte Untersuchung von Bleichraten der Farbstoffmoleküle ist ein aufwendiges Verfahren, so daß es hier nur für wenige Farbstoffe durchgeführt wurde. Nur an TDI in PMMA Filmen wurden bisher die detektierten Photonen von über 80 Molekülen gemessen. Abbildung 144 zeigt die sortierte Darstellung dieser detektierten Photozyklen. Die durchschnittlich detektierte Photonenzahl beträgt demnach $6 \cdot 10^8$ detektierte Ereignisse. Ein monoexponentielles Zerfallsgesetz, wie es für eine Reaktion 1. Ordnung erwartet wird, und dessen Zerfallsrate der normalen Durchschnittsbildung entspricht, kann den gemessenen Kurvenverlauf aber nur unzureichend beschreiben. Ein zweifach exponentieller Ansatz, der zwei etwa gleich große Populationen erfordert, kann die Meßwerte besser erklären. Demnach können von der instabileren Population $\sim 3,6 \cdot 10^7$ und von der langlebigeren sogar rund 10^9 detektierte Photonen erwartet werden.

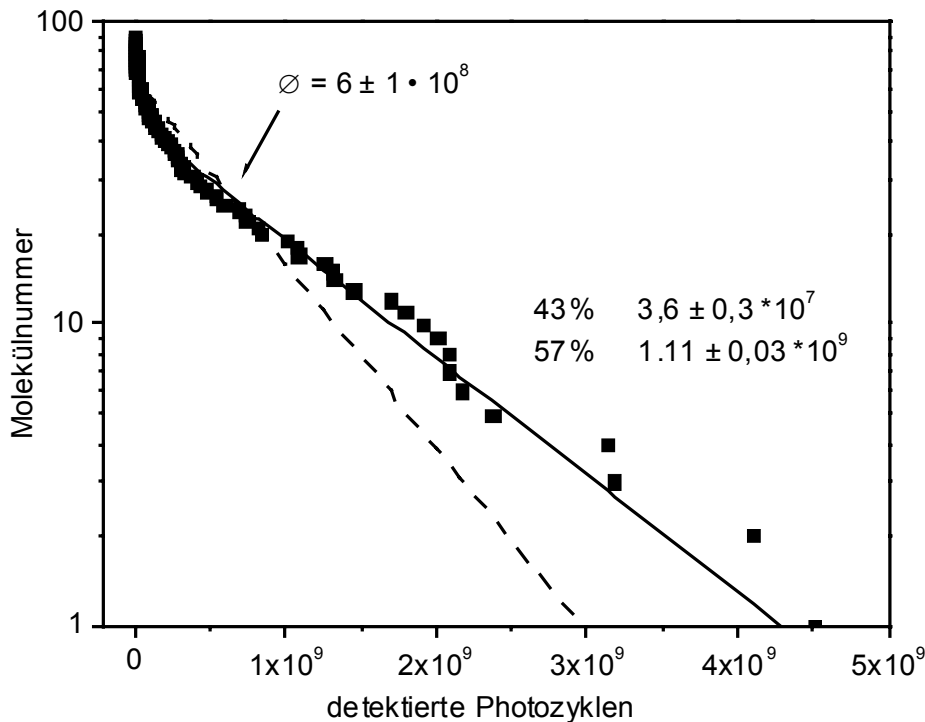


Abbildung 144: Photostabilität von 84 TDI Molekülen in PMMA. Die Auftragung der nach der Größe sortierten Werte ist proportional zur Wahrscheinlichkeit ein Molekül nach der detektierten Photonenzahl anzutreffen. Eine statistischer Zerfall gleicher Moleküle würde zu einer exponentiellen Zerfallskurve (gestrichelte Linie) führen. Vermutlich sind jedoch zwei Populationen vorhanden, die mit einer zweifachen Exponentialfunktion angepaßt werden (durchgezogene Linie).

Berücksichtigt man die Detektionseffizienz der Meßapparatur von $\sim 3\%$ so emittiert der Farbstoff im Durchschnitt $\sim 2 \pm 0,3 \cdot 10^{10}$ Photonen. Bisher ist kein anderes Farbstoff / Polymer -System bekannt, in dem mehr Photozyklen detektiert werden konnten. Die Probe ist so photostabil, daß sie sogar für Justage- und Eichzwecke eingesetzt werden kann.

Von anderen Farbstoffen sind nur wenige Meßwerte vorhanden, so daß auf eine Populationsanalyse verzichtet wurde. Die folgende Tabelle enthält die durchschnittlichen detektierten Photonenzahlen verschiedener Proben.

Probe	Anzahl der Moleküle	durchschnittliche detektierte Photonenzahl	Standardfehler
Oxazin 4 / PMMA	17	713 294	$\pm 526\ 385$
Nilblau / PMMA	15	308 000	$\pm 72\ 217$
Rhodamin 700 / PMMA	21	57 904	$\pm 18\ 037$
Oxazin 1 / PMMA	34	1,26 Mio.	$\pm 0,54$ Mio.

Zum Vergleich wurden diese Werte auch in die Liste der Photostabilitäten von Farbstoffen in Abbildung 54 eingetragen.

4.4.5 Blinken

Einige Farbstoffe weisen neben der Triplettdynamik auch andere Dunkelzustände auf, über deren Ursache bisher noch relativ wenig bekannt ist [Lu1997] [Panzer1998] [Widengren2000] [Jung2001] [Christ2001] [Koberling2001]. Sehr langsames Blinken kann in einer Bilderserie beobachtet werden. Ein Ausschnitt aus einem Bild einer Bilderserie ist in Abbildung 145 dargestellt.

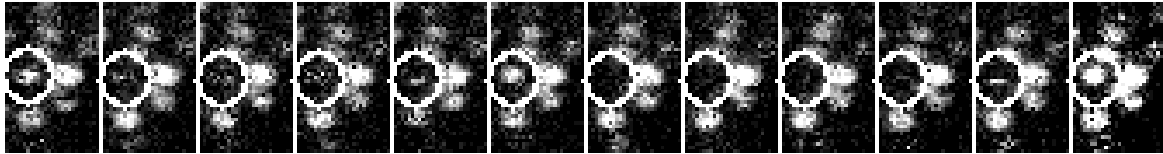


Abbildung 145: Blinken eines einzelnen Oxazin 1 Moleküls. Der Kreis markiert ein einzelnes Molekül, das mehrmals an- und ausgeht. Der Zeitabstand der Bilder beträgt 10 s.

Das mit einem Kreis markierte Oxazin 1 Molekül befand sich zweimal für etwa 40 Sekunden in einem reversiblen Dunkelzustand.

In den porösen Festkörpern zeigt besonders der Farbstoff Cy5 ein ausgeprägtes Blinkverhalten im Sekundenbereich. Untersuchungen an Cy5 in Lösung zeigen eine cis-trans-Isomerisierung im μs Bereich [Widengren2000]. In Abbildung 146 sind zwei charakteristische Zeitspuren von Cy5 Molekülen in MCM-41 dargestellt.

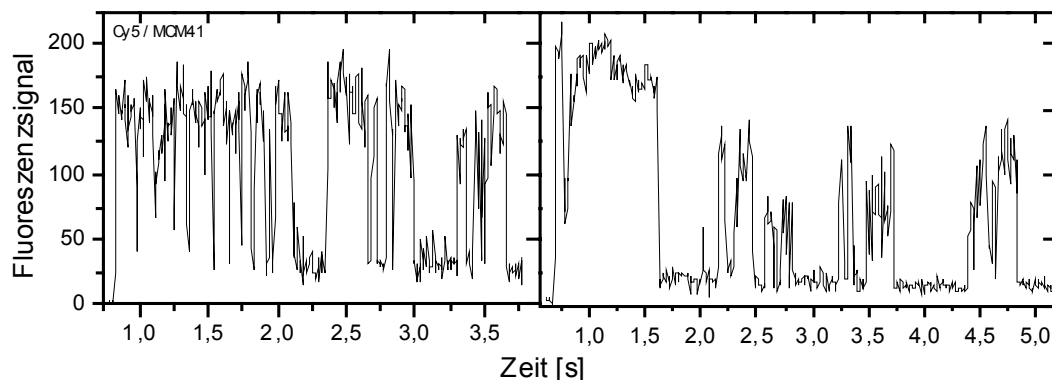


Abbildung 146: Zwei Zeitspuren von einzelnen Cy5 Molekülen in MCM-41. $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$, $I = 3,5 \mu\text{W}$.

In dieser Probe sind die etwa 2,3 nm hohen Cy5 Moleküle kovalent an die innere Porenwand der etwa 2,5 nm großen Pore angebunden worden. Vermutlich wird dadurch die Beweglichkeit der Moleküle so stark eingeschränkt, daß sich die Geschwindigkeit der cis-trans-Isomerisierung in den Sekundenbereich verschiebt.

4.4.6 Diffusion

Neben der internen Dynamik von Farbstoffmolekülen kann auch durch die Diffusion von beweglichen Molekülen eine Intensitätsänderung der Fluoreszenz auftreten. Die

Aufklärung von Diffusionsprozessen kann mit verschiedenen Methoden erreicht werden (siehe Kapitel 2.4.3).

Sind nur noch wenige Farbstoffmoleküle in der Probe vorhanden, können langsame Diffusionsprozesse über die Aufnahme von Bilderserien, die eine Verfolgung der Molekülposition ermöglicht ('single molecule tracing'), beobachtet werden. Schnellere Diffusionsprozesse werden über die Analyse von Fluoreszenzkorrelationsfunktionen charakterisiert. Die maximale Diffusionsgeschwindigkeit, die noch über die Aufnahme von konfokalen Bildern abgebildet werden kann, liegt im Bereich von $10 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (siehe Kapitel 2.4.3). Bei freier Diffusion von kleinen Farbstoffmolekülen in Wasser oder anderen niedrig viskosen Lösungsmitteln liegen die Diffusionskonstanten aber im Bereich von $100 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. FCS ist daher das ideale Mittel die Diffusionskonstanten von schneller Diffusion zu bestimmen. Abbildung 147 zeigt die FCS Kurve einer stark verdünnten Lösung von TDI in CHCl_3 . Der Kurvenverlauf eines Diffusionsprozesses in einer FCS Meßkurve wird nicht wie die interne Dynamik mit einer Exponentialfunktion, sondern mit einer rationalen Funktion der Form $1/(1+t)$ beschrieben.

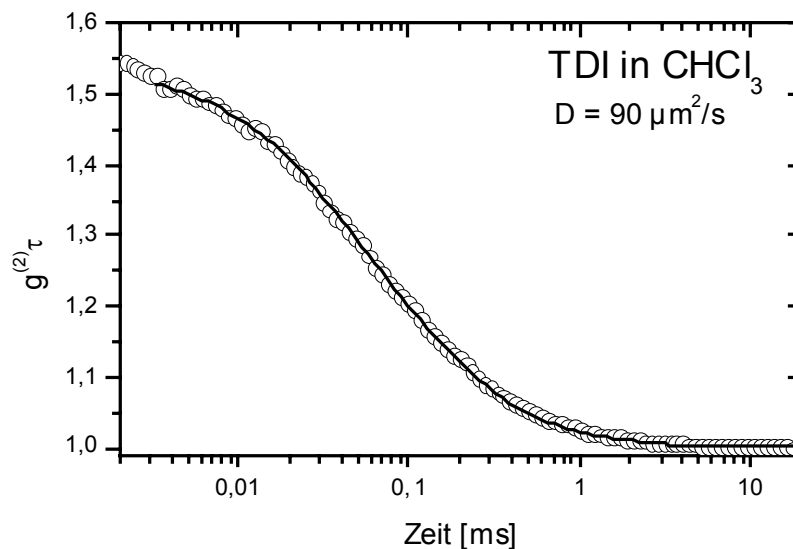


Abbildung 147: FCS-Kurve einer freien Diffusion von TDI in CHCl_3 . $D = 90 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

Die Auswertung der FCS- Diffusionskurven erfolgt gemäß der in Kapitel 2.6.2.2.1 beschriebenen Methode mit der Gleichung (49) . Nach dieser Methode erhält man für TDI in CHCl_3 die Diffusionskonstante $D = 90 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

4.4.7 TDI Monolith

Relativ langsame Diffusion kann in mesostrukturiertem M41S Materialien beobachtet werden. In dieser Probe die einen Flüssigkristall als Templat enthält, der die hexagonale Porenstruktur bestimmt, wurde während der Synthese der Farbstoff TDI eingelagert. Von diesem Material können Zentimeter große homogene Monolithe erhalten werden (siehe Kapitel 3.2.4), in denen einzelne TDI Farbstoffmoleküle detektiert werden können (siehe Kapitel 4.3.2.3). Bei einer schnellen Aufnahme einer Bilderserie kann die Bewegung der einzelnen TDI Moleküle beobachtet werden.

Abbildung 148 zeigt den Ausschnitt aus einem typischen konfokalen Fluoreszenzbild an dieser Probe.

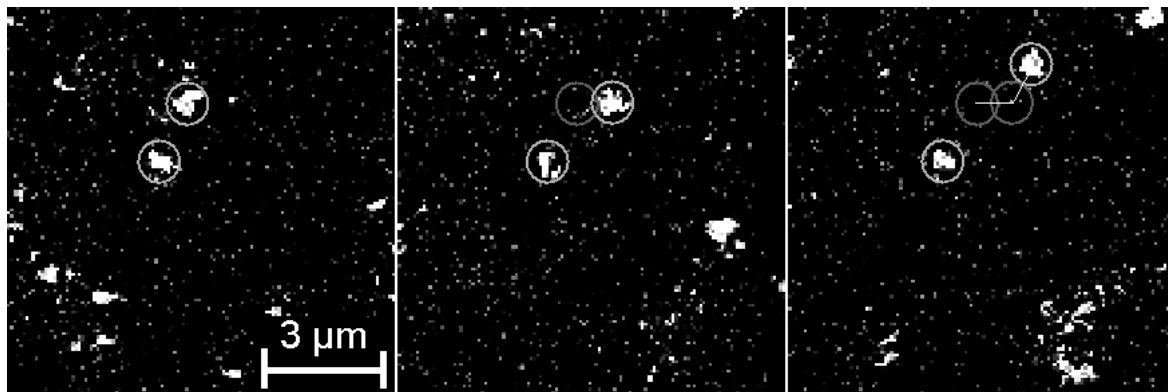


Abbildung 148: Einzelnes diffundierendes TDI Molekül in einem mesoporösen M41S Wirt. In den drei aufeinanderfolgend im Zeitabstand von 4,08 s aufgenommenen Bildern diffundiert das obere Molekül, während das untere Molekül unverändert bleibt.

Im ersten Bild (links) wurden die Position von zwei Molekülen mit einem Kreis markiert. Das untere der beiden Moleküle bleibt im Verlauf der beiden folgenden Bilder an seiner Position, während sich das obere Molekül fortbewegt. Um den Verlauf der Bewegung besser sichtbar zu machen, wurden die alten Molekülpositionen in den darauf folgenden Bildern mit eingezeichnet. Auf diesem Weg kann die Diffusionsbewegung des Moleküls als zweidimensionale Projektion der Trajektorie dargestellt werden. Eine solche Trajektorie ist in Abbildung 149 dargestellt.

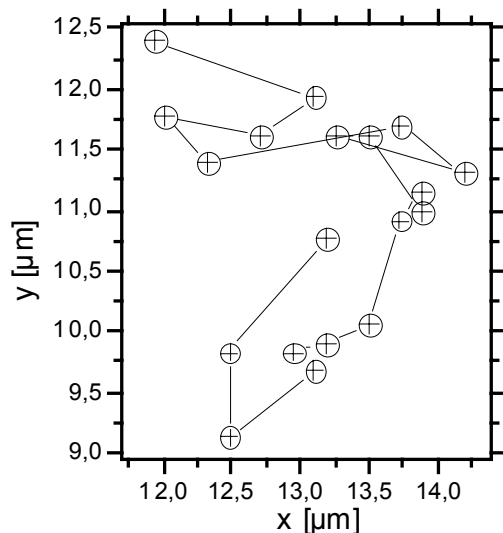


Abbildung 149: Rekonstruierte Trajektorie eines einzelnen TDI Moleküls in einem M41S Monolith. 19 Positionen mit einem Zeitabstand von 4,08 s konnten an diesem Molekül bestimmt werden.

Es kann hier keine Orientierung der Diffusion beobachtet werden, obwohl die Probe aus einer hexagonalen Anordnung von eindimensionalen Kanälen besteht. Dies bedeutet, daß die Poren auf einer Länge von unter ~ 100 nm eine Krümmung

aufweisen müssen. Bildlich kann man sich dies mit einer Portion verknäulter Spaghetti vorstellen, die im Nahbereich eine regelmäßige Packung von eindimensionalen Strängen besitzen, in der Größe des Tellers jedoch keine eindimensionale Ordnung mehr besitzen. Es kann keine Anisotropie der Probe im Rahmen der Lokalisierungsgenauigkeit von etwa 100 nm beobachtet werden. Daher kann nur eine makroskopische Diffusionskonstante D_M für die beobachtete isotrope Diffusion bestimmt werden. Unterhalb von etwa 100 nm kann diese in eine eindimensionale mikroskopische Diffusionskonstante übergehen. Aufgrund der Theorie der Diffusion ist die mittlere quadratische Diffusionslänge proportional zur Zeit (siehe Kapitel 2.4.1). Wenn, wie hier der Fall, nur die zweidimensionale Projektion der Bewegung beobachtet wird, ist der Proportionalitätsfaktor die vierfache Diffusionskonstante (siehe Gleichung (4)).

Um die mittlere quadratische Diffusionslänge für alle verfügbaren Zeitabstände zu berechnen, werden aus allen Trajektorien die Diffusionslängen r extrahiert. Für einen Zeitabstand werden nun die ermittelten r -Werte nach fallender Größe sortiert und numeriert. Die Nummer der sortierten Werte wird nun gegen ihren quadrierten r -Wert angetragen. Abbildung 150 zeigt dieses Diagramm für einen Zeitabstand von 12 s.

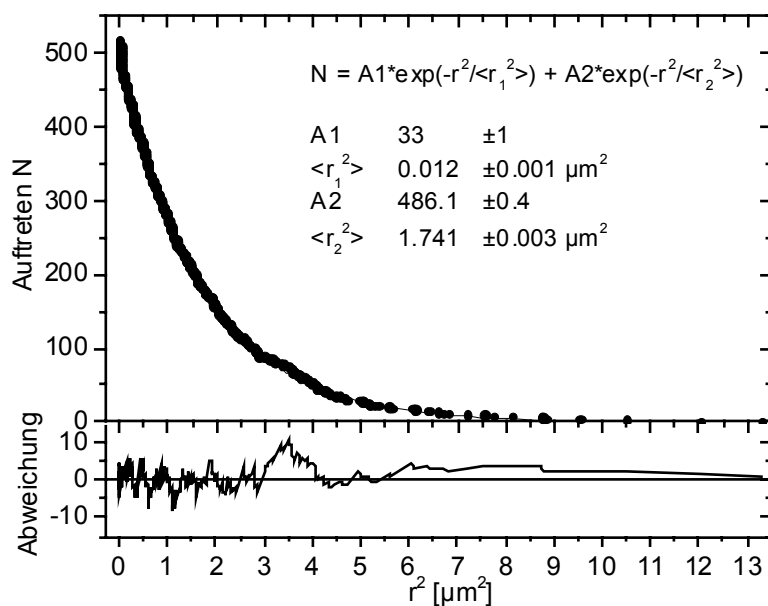


Abbildung 150: Beispiel für die Berechnung der mittleren quadratischen Diffusionslänge $\langle r^2 \rangle$ aus den Trajektorien. Für einen Zeitabstand von 12 s wird eine mittlere quadratischen Diffusionslänge von $1,71 \mu\text{m}^2$ gefunden. Eine zweite Komponente besitzt eine mittlere quadratische Diffusionslänge von $0,012 \mu\text{m}^2$

Das Diagramm kann als die Wahrscheinlichkeitsdichte ein Molekül im Abstand r^2 anzutreffen interpretiert werden. Diesen Zusammenhang stellt auch die Gaußverteilung in Gleichung (6) her. Daher kann durch Anpassen einer Kurve nach Gleichung (91) die mittlere quadratischen Diffusionslänge $\langle r^2 \rangle$ ermittelt werden.

$$N = A \cdot e^{\frac{-r^2}{\langle r^2 \rangle}} \quad (91)$$

Treten mehrere verschieden Diffusionsprozesse auf, so können diese durch eine Überlagerung mehrerer Kurven nach Gleichung (91) getrennt, bestimmt werden. Wie aus Abbildung 148 zu sehen war, sind in der Probe einige nicht oder nur extrem langsam diffundierende Moleküle vorhanden. Die Diffusionslängen, die für diese Moleküle bestimmt werden, liegen im Bereich der Genauigkeit der Positionsbestimmung von 100 nm. Da es sich hierbei nur um einen kleinen Anteil an der Gesamtzahl der untersuchten Moleküle handelt, sind für kurze Zeiten nur sehr wenige Daten vorhanden (etwa die Ereignisse zwischen 490 und 520 in Abbildung 150). Bei langen Zeiten, bei der die meisten beweglichen Moleküle schon aus der Fokalebene der Bilder diffundiert sind, werden die Daten der immobilen Moleküle deutlich sichtbar. Abbildung 151 zeigt ein Beispiel für die Ermittlung der mittleren quadratischen Diffusionslänge mit einem Zeitabstand von 61 s.

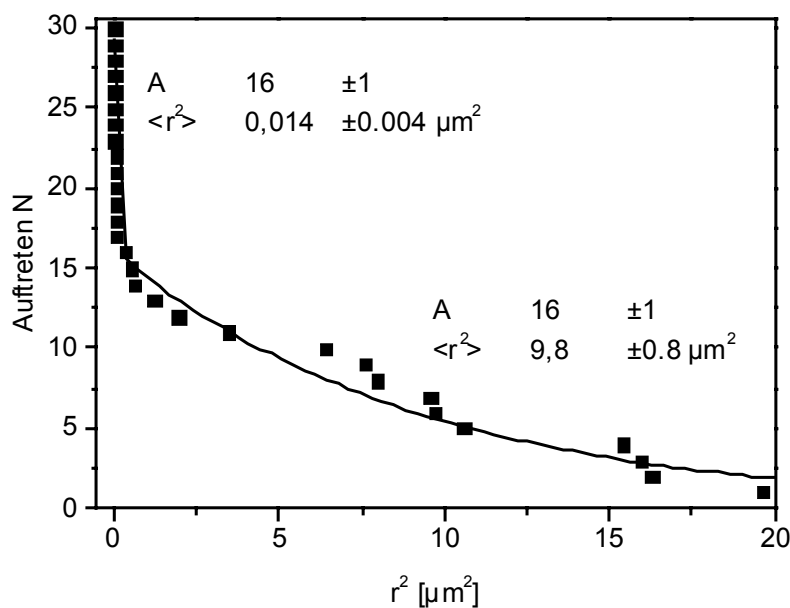


Abbildung 151: Beispiel für die Berechnung von $\langle r^2 \rangle$ für sehr lange Zeitabstände. Hier sind die beiden Populationen deutlich sichtbar. Die kurzen $\langle r^2 \rangle = 0,014 \mu\text{m}^2$ Abstände entsprechen der Lokalisierungsgenauigkeit der immobilen Moleküle.

Der kleinere ermittelte Wert von $\langle r^2 \rangle = 0,014 \mu\text{m}^2$ muß hier als maximale Obergrenze für eine möglicherweise vorhandene Restbewegung der immobilen Moleküle verstanden werden. Für ein wirklich immobiles Verhalten sprechen auch die Winkelbestimmungen von Kapitel 4.6.7. In diesem Fall kann der Fehler in der Bestimmung der Molekülposition zu: $\Delta r = 120 \text{ nm}$ berechnet werden. Dieser relativ große Fehler liegt vermutlich an der manuellen Bestimmung der Molekülpositionen (siehe Programm im Anhang 8.5.2.4). Insbesondere wird dabei keine zweidimensionale Gaußfunktion an die Meßwerte angepaßt wie in Kapitel 4.3.1.2.

Nachdem für alle Zeitabstände die $\langle r^2 \rangle$ Längen berechnet sind, können diese gegen den Zeitabstand angetragen werden (siehe Abbildung 152). Eine nach den Fehlern der Meßpunkte gewichtete lineare Anpassung ergibt nach Gleichung (4) eine makroskopische Diffusionskonstante der TDI Moleküle von $D_M = 3.72 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Eine Abweichung vom linearen Verhalten, die bei anormaler Diffusion auftritt, wird

nicht beobachtet. Die maximal mögliche Diffusionskonstante der stationären Population liegt unter $10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

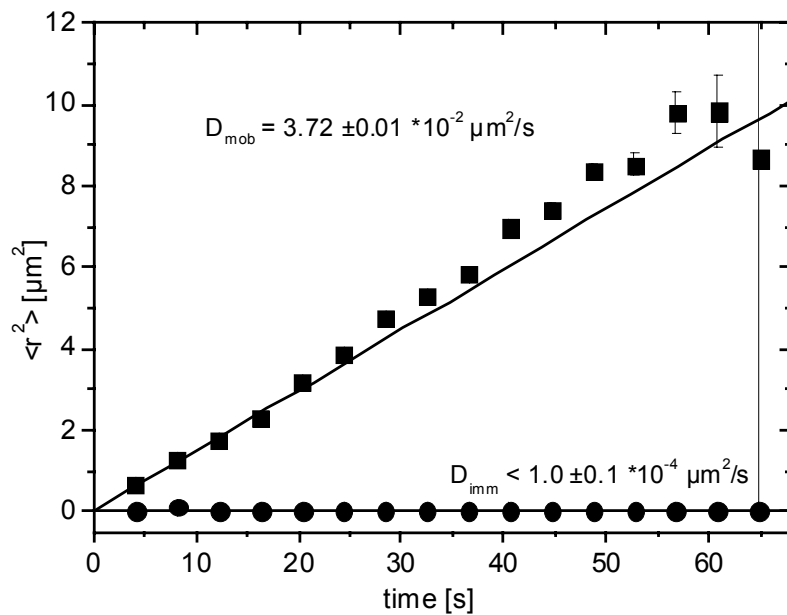


Abbildung 152: Lineare Zeitabhängigkeit der mittleren quadratischen Diffusionslänge $\langle r^2 \rangle$. Die runden Punkte geben die immobile Fraktion an. 1/4 der Steigung entspricht nach Gleichung (4) der Diffusionskonstante.

Eine andere Probe wurde in CHCl_3 eingebettet. Das Lösungsmittel dient hier zum einen zur Anpassung des Brechungsindex, und zum anderen zur Nachbelegung mit weiteren TDI-Molekülen. Es scheint, daß einige Monate nach der Synthese die Konzentration der TDI-Moleküle in der Probe abnimmt. Es wird hier gezeigt, daß CHCl_3 in die Porenstruktur eindiffundiert und dadurch dort zu einer verlangsamten Diffusion führt. Ausgewertet wurde hier eine Bilderserie mit 500 Bildern, die im Zeitabstand von 0,58 s aufgenommen wurden. Aus den quadrierten Diffusionslängen der Trajektorien werden, wie zuvor beschrieben, die mittleren quadratischen Diffusionslängen $\langle r^2 \rangle$ bestimmt. Abbildung 153 zeigt diese Analyse für einen Zeitabstand von 2,3 s (4 Bilder).

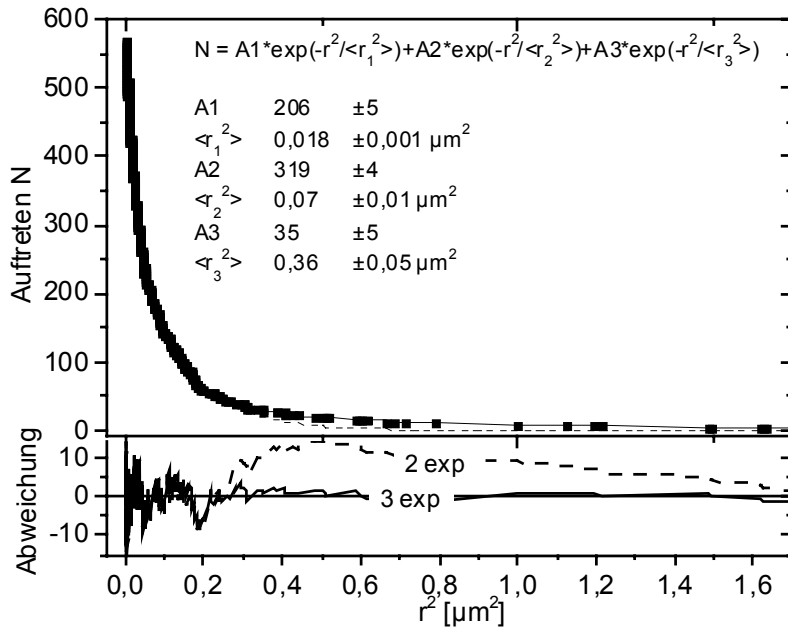


Abbildung 153: Beispiel für die Berechnung der mittleren quadratischen Diffusionslänge $\langle r^2 \rangle$ aus den Trajektorien. Es werden drei quadratische Diffusionslängen (durchgezogene Linie) gefunden, da die Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen (gestrichelt) die Meßwerte nur schlecht beschreibt.

Eine Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen nach Gleichung (91) kann die Meßpunkte nur schlecht beschreiben. Daher werden bei dieser Probe drei Diffusionsprozesse angenommen. Um den Diffusionsverlauf zu charakterisieren, werden die ermittelten $\langle r^2 \rangle$ Längen wieder gegen die Zeitabstände angetragen (siehe Abbildung 154).

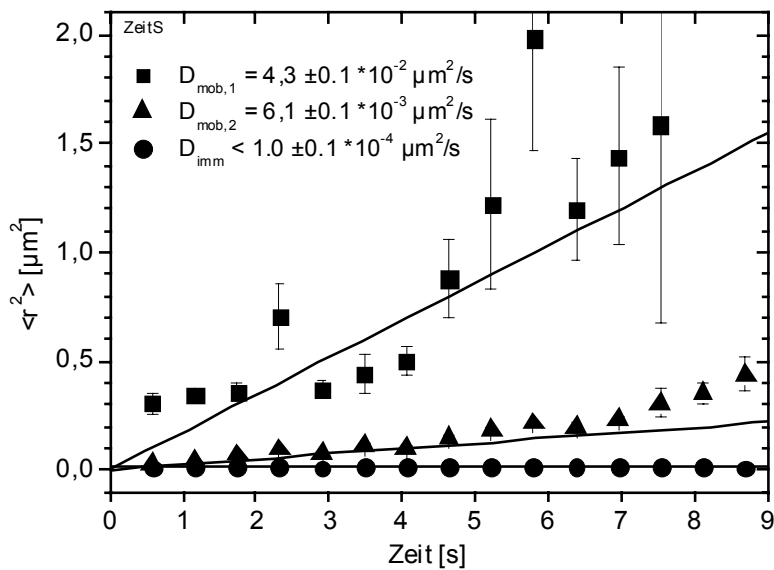


Abbildung 154: Lineare Zeitabhängigkeit der mittleren quadratischen Diffusionslängen $\langle r^2 \rangle$. Die runden Punkte geben die immobile Fraktion an. 1/4 der Steigung ist nach Gleichung (4) die Diffusionskonstante D.

Die lineare Zeitabhängigkeit ist bei dieser Probe nicht so gut ausgeprägt, da die Abhängigkeit der verschiedenen $\langle r^2 \rangle$ Werte aufgrund der triexponentiellen Anpassung größer ist. Auch in dieser Probe kann der langsamste Prozeß mit $D_{\text{imm}} < 10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ einer Fraktion von unbeweglichen Molekülen zugeschrieben werden. Der schnellste Diffusionsprozeß mit $D = 4,3 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ paßt vom Zahlenwert gut zu dem zuvor bestimmten Wert von $D_M = 3.72 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ von der in Polymer eingebetteten Probe. Somit tritt durch die Anwesenheit von CHCl_3 eine zusätzliche langsame Diffusion mit $D = 6,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ auf. Ob die beiden mobilen Diffusionsprozesse strikt getrennt sind oder ob es Moleküle gibt, die zwischenzeitlich wechseln, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Eine entsprechende Analyse der quadratischen Diffusionslängen mit einer 'stretched' Exponentialfunktion in Abbildung 153 paßt nur geringfügig schlechter zu den Meßwerten.

4.4.8 TDI Flüssigkristall

Die Farbstoffmoleküle diffundieren in den M41S Monolithen in den mizellaren Strukturen des Flüssigkristalls der die Porenstruktur bestimmt. Um den Einfluß der Porenstruktur auf die Diffusion zu untersuchen, wird hexagonale Phase des Flüssigkristalls aus gleichen Teilen des Tensids OMO und Wasser hergestellt. Dabei stellt sich heraus, daß in dieser Phase die Diffusion der einzelnen TDI Moleküle viel schneller ist als in der silikalisierten Monolithprobe. Aufgrund der hohen Diffusionsgeschwindigkeit ist es nicht möglich Bilderserien aufzuzeichnen, aus denen sich Diffusionstrajektorien ableiten lassen. Es kann jedoch eine eindimensionale Diffusion detektiert werden. Abbildung 155 zeigt ein sehr schnell gerastertes konfokales Fluoreszenzbild der Probe.

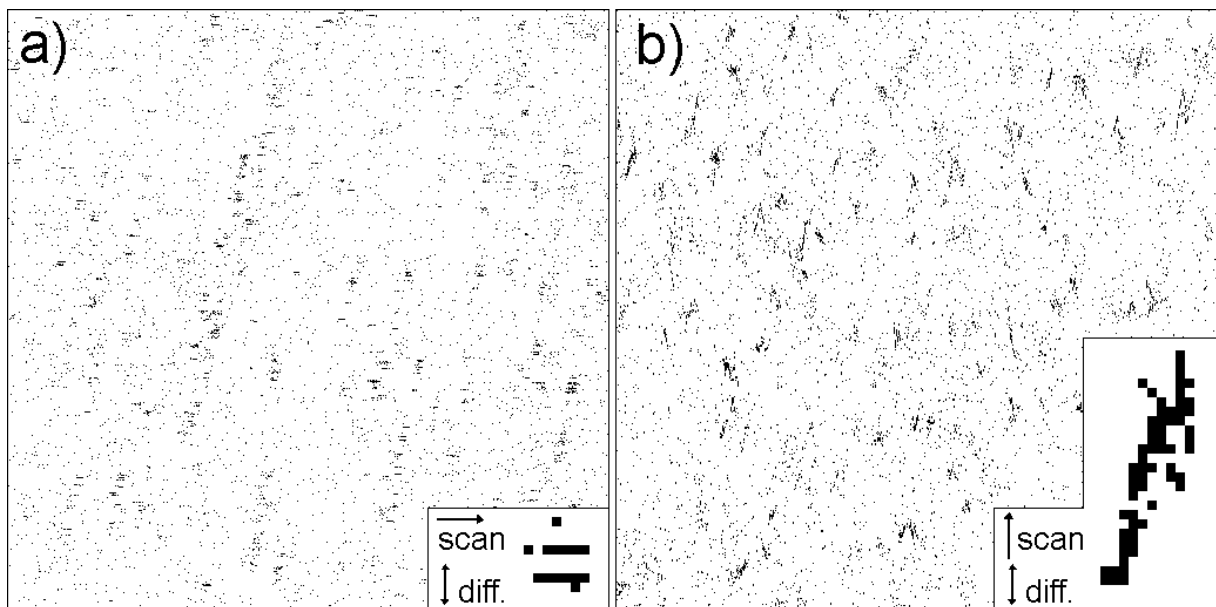


Abbildung 155: Eindimensionale Diffusion von TDI in der hexagonalen Phase des OMO Flüssigkristalls. Bildgrößen $20 \times 20 \mu\text{m}$. Aufnahmezeiten 2 s. Die schnelle Rasterrichtung der Probe ist in a) horizontal und in b) nahezu vertikal (87°). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen ein typisches Signal eines einzelnen TDI Moleküls mit Pfeilen von der schnellen Scanrichtung und der Diffusionsrichtung.

Im linken Bild sind schwache Strukturen zu sehen, die sich fast vertikal über das Bild erstrecken. Nun muß bei der Interpretation des Bildes berücksichtigt werden, daß das konfokale Bild gerastert aufgenommen wird. Dabei erfolgt die schnelle Aufnahme entlang einer Zeile von links nach rechts mit dem Pixeltakt (hier 30 μs) und die langsamere Aufnahme der verschiedenen Zeilen von oben nach unten mit der Zeilenrate (hier 7,8 ms). Diffundiert nun ein einzelnes Molekül langsam genug durch das Bild, so daß es noch bei der Aufnahme einer Zeile vollständig detektiert wird, aber so schnell, daß es in der nächsten aufgenommenen Zeile nicht mehr vorhanden ist, so entsteht ein einzelner kurzer horizontaler Strich im Bild. Dies ist nicht ungewöhnlich und wird, bei der Aufnahme von gerasterten Bildern, in allen schnell diffundierenden Systemen beobachtet. Die Länge des horizontalen Striches von etwa 4 Bildpunkten entspricht dem konfokalen Auflösungsvermögen von etwa 300 nm. Die vertikalen Strukturen in Abbildung 155 a lassen jedoch eine bevorzugte Diffusionsrichtung vermuten. Eine Drehung der gesamten Bildaufnahme um fast 90° führt zu einem total verschiedenen Muster. Nun werden die Bildpunkte von unten nach oben und die verschiedenen Zeilen von links nach rechts aufgenommen. Ein vertikal diffundierendes Molekül wird diesmal in mehreren Zeilen detektiert. Das detektierte Signal in verschiedenen Zeilen ist jedoch durch die erfolgte Diffusion nach oben oder unten versetzt. Durch eine Abschätzung des Versatzes von etwa 2 Pixeln (156 nm) pro Zeile, die 0,078 s später detektiert wird, kann nach der eindimensionalen Diffusionsgleichung (3) eine Diffusionskonstante von 1,6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ abgeschätzt werden.

Für eine genauere Bestimmung der Diffusionskonstante wurde die flüssigkristalline Phase mittels FCS untersucht. Die Gleichung (50) der Autokorrelationsfunktion für eindimensionale Diffusion senkrecht zur optischen Achse ist in Kapitel 2.6.2.2.1 beschrieben.

Abbildung 156 zeigt die gemessenen Werte mit den jeweiligen Anpassungen nach dem drei- zwei- und eindimensionalen Modell.

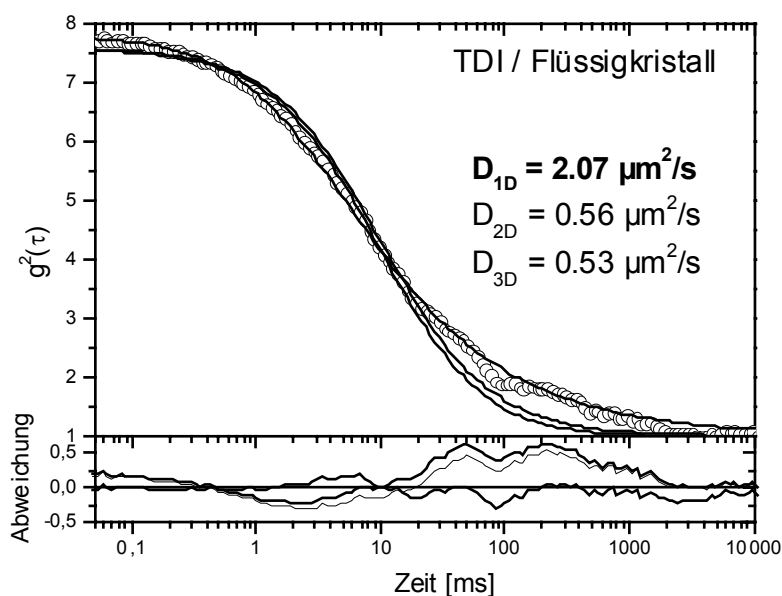


Abbildung 156: Anpassung der gemessenen FCS-Daten mit dem eindimensionalen (dick) und zwei bzw. dreidimensionalen (dünn) Modell.

Die dicke Linie des eindimensionalen Diffusionsmodells nach Gleichung (50) kann die Meßdaten eindeutig am Besten erklären. Die ermittelte eindimensionale Diffusionskonstante von $D_{1D,LC} = 2.07 \pm 0,03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (mit $w = 150 \text{ nm}$) steht mit der Abschätzung aus den konfokalen Bildern in guter Übereinstimmung.

4.4.9 Vergleich der Diffusion Monolith / Flüssigkristall

Vergleicht man die Diffusionskonstanten von TDI in den verschiedenen Umgebungen: CHCl_3 : $90 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, flüssigkristalline Phase: $2.07 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, flüssigkristalline Phase mit Silikatwänden: $0,0372 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, so wird in dieser Reihenfolge die Diffusion bei jedem Schritt drastisch verringert. Der Übergang von Chloroform zum Flüssigkristall kann gut mit einer höheren Viskosität des Flüssigkristalls erklärt werden. Die über 50 fache Verlangsamung durch die Bildung der Silikatwände um die Mizellen kann durch zwei Effekte erklärt werden. Zum einen schrumpft der Durchmesser der Mizellen durch die Bildung der Silikatstruktur um etwa 5% wie durch Röntgenstrukturuntersuchungen gezeigt wurde [Attard1995]. Diese massivere Packung könnte die Diffusion erschweren. Zum anderen entsteht durch die starke Verkrümmung der Poren, wie sie in der silikalisierten Probe gefunden wird, ein längerer Diffusionsweg. Da der exakte Diffusionsweg bei der Messung der Trajektorien vermutlich nicht aufgelöst wird, kann hier nur die makroskopische Diffusionskonstante bestimmt werden. Ist aber die eigentliche Weglänge, um z.B. 100 nm im mesoporösen Festkörper zurückzulegen, aufgrund der verdrehten Poren 700 nm lang, so würde sich bei Messungen im Maßstab von über 100 nm genau die hier beobachtete 50 fach verkleinerte makroskopische Diffusionskonstante finden. ($700^2/100^2 = 49$). Vermutlich ist eine Mischung beider Effekte für die verringerte Diffusionskonstante verantwortlich.

4.4.10 Schmelzen von Octadecan mit TDI

Ziel dieses Versuches ist es einzelne TDI-Moleküle beim Schmelzen der Umgebung zu beobachten. Dafür wird eine $\sim 10^{-12}$ molare Probe von TDI in Octadecan hergestellt. Der Schmelzpunkt von Octadecan liegt mit 28°C knapp über Raumtemperatur. Zum Regulieren der Temperatur wird ein Peltierelement verwendet, das mit Silikon auf den Objektträger geklebt wird [Knörr2000]. Durch ein Loch im Peltierelement wird Temperatur nahe an der Probe gemessen. Aufgrund des hohen Wärmekontakts über das Immersionsöl zwischen Probe und dem Mikroskopobjektiv kann die Temperatur aber nur auf $\pm 2^\circ\text{C}$ bestimmt werden. Zur Messung wird die Probe ausgehend von 10°C langsam zum Schmelzen erhitzt. Bis zum Schmelzen bei $\sim 29^\circ\text{C}$ sind die Positionen der Moleküle bis auf eine Ausnahme stabil. Danach ist die Diffusion der Moleküle so schnell, daß anstatt der runden Punkte nur kurze Striche in konfokalen Bild detektiert werden. Abbildung 157 zeigt das Bild während dem Schmelzvorgang. Nach dem Kühlen auf ca. 28°C wird die Probe wieder fest, so daß wieder unbewegliche TDI Moleküle beobachtet werden.

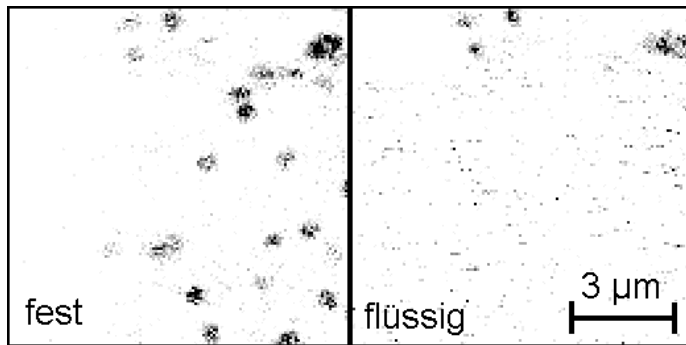


Abbildung 157: Einzelmolekülbilder von TDI während dem Schmelzen der Octadecan Umgebung. Im letzten Bild vor dem Schmelzen (links) sind die Moleküle noch deutlich erkennbar. Nach dem Schmelzen (rechts, im oberen viertel) diffundieren die Moleküle sehr schnell und können daher nicht lokalisiert werden.

Ein einziges Molekül zeigte Diffusion im festen Octadecan bei 10 bis 15°C. Abbildung 158 zeigt das Erste und das Letzte von 10 Bildern, in denen dieses diffundierende Molekül beobachtet wird.

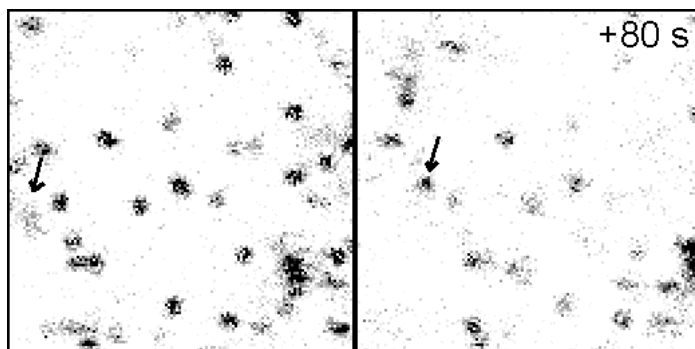


Abbildung 158: Diffundierendes TDI-Molekül im festen Octadecan. Der Pfeil entspricht etwa dem Diffusionsweg. Zwischen den ersten Bild (links) und dem letzten Bild (rechts) liegen zehn weitere Bilder im Abstand von 8 s. Bildgröße 10µm.

Aufgrund der gleichzeitigen Erwärmung der Probe driftet das gesamte Bildfeld etwas nach rechts. Wird diese Drift aus den unbeweglichen Molekülen bestimmt, kann dennoch die Trajektorie des diffundierenden Moleküls ermittelt werden (siehe Abbildung 159). Auffällig ist die gerade Form der Trajektorie.

In der festen Hexadecan Probe kann somit ein viskoser Bereich nachgewiesen werden, in dem ein einzelnes TDI-Molekül diffundieren kann.

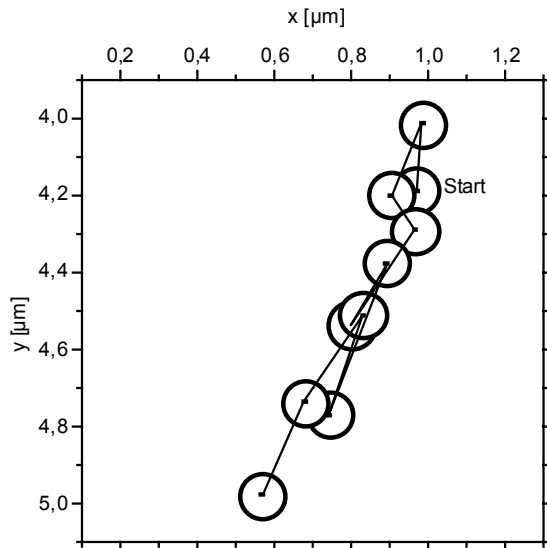


Abbildung 159: Driftkorrigierte Trajektorie eines einzelnen TDI-Moleküls in festem Octadecan. Die eingezeichnete Punktgröße entspricht in etwa der Lokalisierungsgenauigkeit.

4.5 Orientierung von vielen Farbstoffmolekülen (Ensemble)

Dieses Kapitel beschreibt Untersuchungen von Farbstofforientierungen, die durch polarisationsabhängige Messungen an Proben, die eine hohe Konzentration von Farbstoff enthalten, durchgeführt wurden.

Nahezu alle Fluoreszenzfarbstoffe besitzen ein eindimensionales Übergangsdipolmoment μ . Ist die Polarisationsrichtung des Anregungslichtes exakt senkrecht dazu orientiert, so kann der Farbstoff kein Licht aufnehmen. Wird eine Messung mit variabler Polarisationsrichtung durchgeführt, so erhält man einen \cos^2 förmigen Absorptionsverlauf. Ist ein gewisser Anteil der Farbstoffmoleküle nicht exakt in eine Richtung orientiert, so werden immer einige Licht aufnehmen können. Das bedeutet, es gibt dann keine Polarisationsrichtung in der keine Absorption auftritt. Wird unpolarisiert detektiert, hängt die Signalintensität von Polarisationswinkel ϕ und von der Winkelverteilung $N_{2D}(\alpha)$ der Farbstoffmoleküle ab:

$$I(\phi) = \int_{-\infty}^{\infty} N(\alpha) \cdot \cos^2(\alpha - \phi) d\alpha \quad (92)$$

Unabhängig von der Winkelverteilungsfunktion entsteht dabei wieder ein \cos^2 förmiger Signalverlauf, zu dem ein konstanter Anteil addiert ist. Das bedeutet aber auch, daß aus der Signalkurve nicht mehr auf die Form der Winkelverteilung geschlossen werden kann. Das Verhältnis von minimalem zu maximalem Signal wird als Modulationsverlust v bezeichnet. Abbildung 160 demonstriert, wie der Modulationsverlust durch nicht orientierte Farbstoffmoleküle zustande kommt.

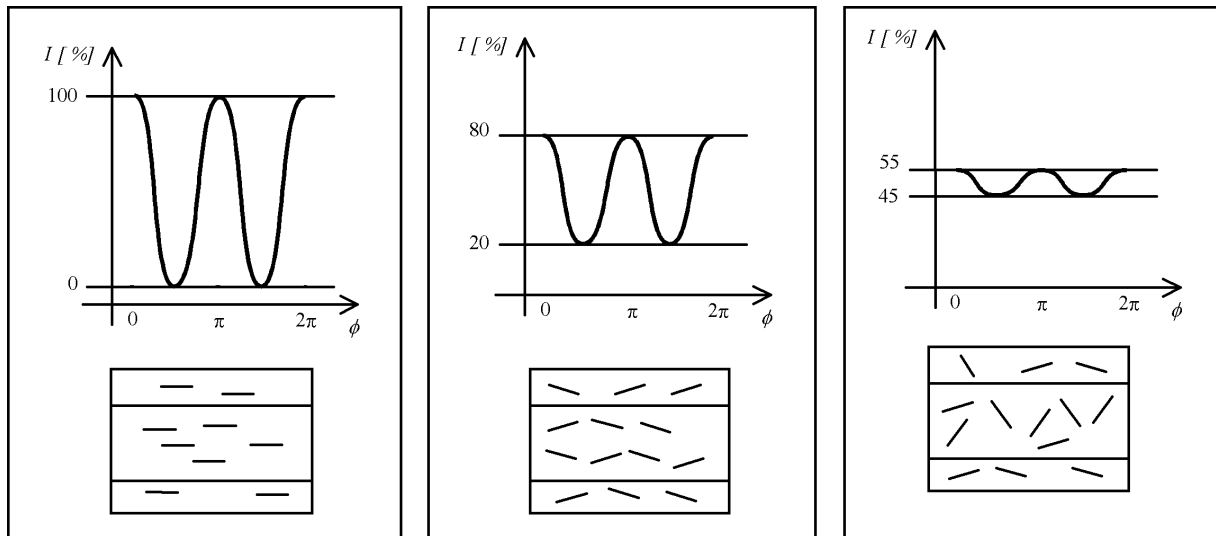


Abbildung 160: Demonstration des Modulationsverlusts durch nicht perfekt orientierte Farbstoffmoleküle. Links: Optimale Orientierung, Mitte: gute Orientierung, Rechts: schwache Orientierung.

Für drei verschiedene Winkelverteilungen soll der Modulationsverlust v in Abhängigkeit von der Breite der Verteilung numerisch berechnet werden.

Bei einer gaußförmigen (statistischen) Verteilung streut der Orientierungswinkel der Moleküle um 0° mit dem Winkel β , der hier als die halbe Halbwertsbreite einer Gaußfunktion verwendet wird:

$$N(\alpha) = e^{-\frac{\ln(0,5) \cdot \alpha^2}{\beta^2}} \quad (93)$$

Bei einer Stufenfunktion sind alle Winkel zwischen $-\beta$ und $+\beta$ gleichwahrscheinlich, größere Winkel aber nicht vorhanden.

$$N(\alpha) = \begin{cases} 1 & \text{für } |\alpha| \leq \beta \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (94)$$

Der dritte Fall, der hier berechnet werden soll, ist eine Delta-Funktion, bei der alle Winkel genau mit dem Winkel β verteilt sind.

Die Rotationskörper um die z-Achse dieser Funktionen sind in Abbildung 161 skizziert.

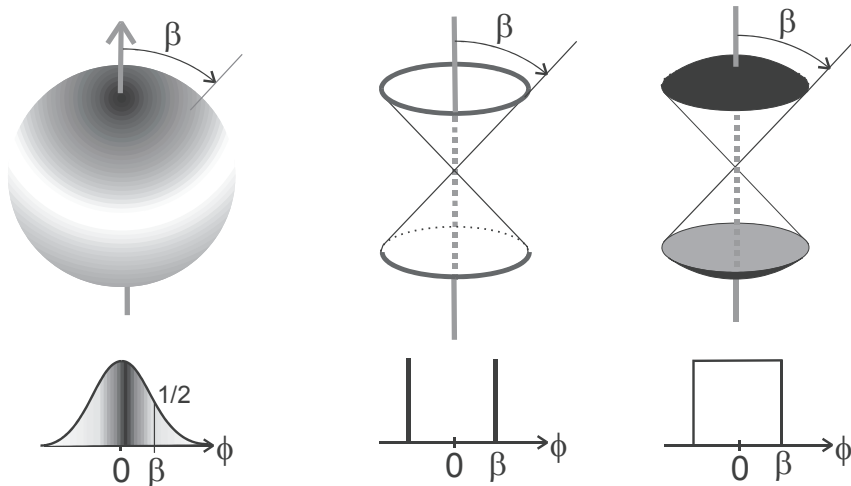


Abbildung 161: Rotationskörper von einer Gauß-, Delta- und Stufenverteilung der Orientierungswinkel.

Aus diesen Rotationskörpern wird anschließend die zweidimensionale Projektion $N_{2D}(\alpha)$ auf die xz -Ebene berechnet, da aus dieser Ansicht auch die Messungen durchgeführt werden. Bei der Gaußfunktion bleibt dabei die Form erhalten. Die Stufen- und Deltafunktion ergeben dagegen Projektionen, die einen maximalen Winkel (β) besitzen. Schließlich führt eine numerische Lösung der Gleichung (92) zu einem, von der Winkelverteilung $N_{2D}(\alpha)$ und dem Polarisationswinkel ϕ abhängigen Signal.

Ein Beispiel für das polarisationsabhängig detektierte Signal einer 37° breiten deltaförmigen Winkelverteilung ist in Abbildung 162 dargestellt.

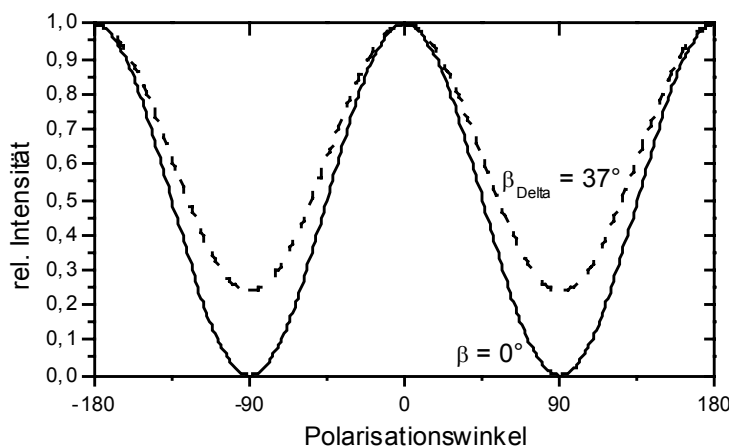


Abbildung 162: Simuliertes Detektionssignal bei einer deltaförmigen Winkelverteilung mit $\beta = 37^\circ$, und einer vollständig orientierten Probe $\beta = 0^\circ$. Bei senkrechter Anregungspolarisation verschwindet bei $\beta > 0^\circ$ das Signal nicht mehr.

Der Informationsinhalt dieser polarisationsabhängigen Kurven kann auf eine Zahl, dem Modulationsverlust v , reduziert werden. Der Modulationsverlust v ist das Verhältnis von senkrechter (90°) zu paralleler (0°) Anregungspolarisation. Abbildung

163 zeigt den Modulationsverlust in Abhängigkeit von den Breiten der Verteilungsfunktionen.

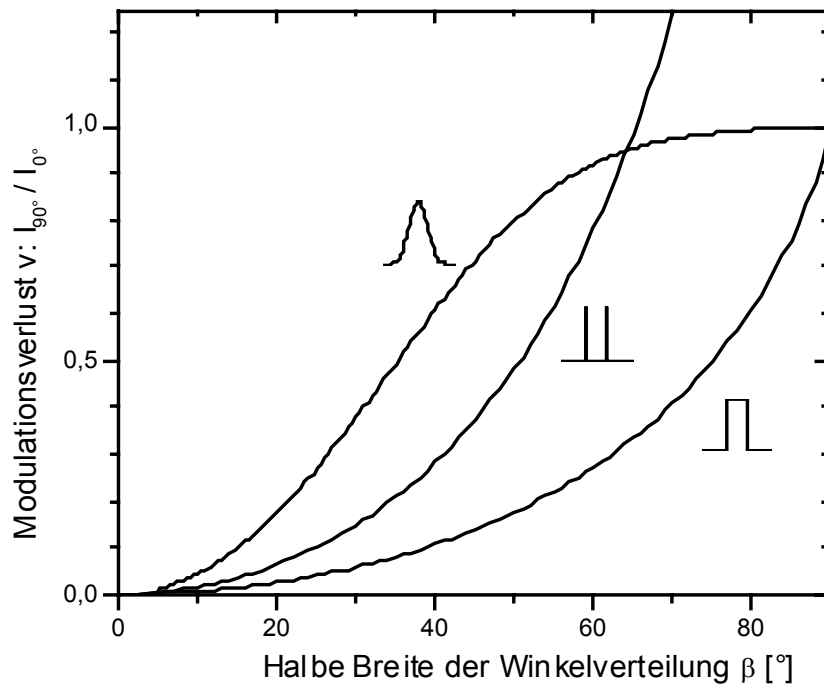


Abbildung 163: Berechneter Modulationsverlust v in Abhängigkeit von einer gauß-, delta- oder stufenförmigen Winkelverteilung mit der Breite β . Der Winkel β ist der typische halbe Öffnungswinkel der dreidimensionalen, rotationssymmetrischen Farbstofforientierung.

Daraus ist ersichtlich, daß sich die drei Modelle erheblich unterscheiden. Bei der Gaußfunktion ist der Modulationsverlust aufgrund der breiteren Basis stärker als bei den plötzlich abfallenden Delta- und Stufenfunktion. Umgekehrt kann aus der experimentellen Bestimmung des Modulationsverlustes nur bei Kenntnis der Form der Verteilungsfunktion der Verteilungswinkel β bestimmt werden.

4.5.1 $\text{AlPO}_4\text{-5}$ - Oxazine

$\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle wurden während der Synthese mit Oxazin Farbstoffe verschiedener Größen beladen. Es wird an Proben mit einer hohen Farbstoffkonzentration (10^{-5} mmol/g) gearbeitet, um mit geringen Anregungsleistungen ein Bleichen der Farbstoffe gering zu halten. Die Anregung erfolgt dabei mit einer rotierenden $\lambda/2$ Platte welche die Polarisation kontinuierlich dreht. Da das konfokale Fluoreszenzsignal wieder 'zurückgedreht' den polarisationsempfindlichen dichroitischen Strahlteiler passiert, wird nicht polarisationsselektiv detektiert. Das Übergangsdipolmoment von Oxazinfarbstoffen liegt entlang der langen Molekülachse (siehe Kapitel 3.1.6). Abbildung 164 zeigt die polarisationsabhängigen Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Oxazinproben.

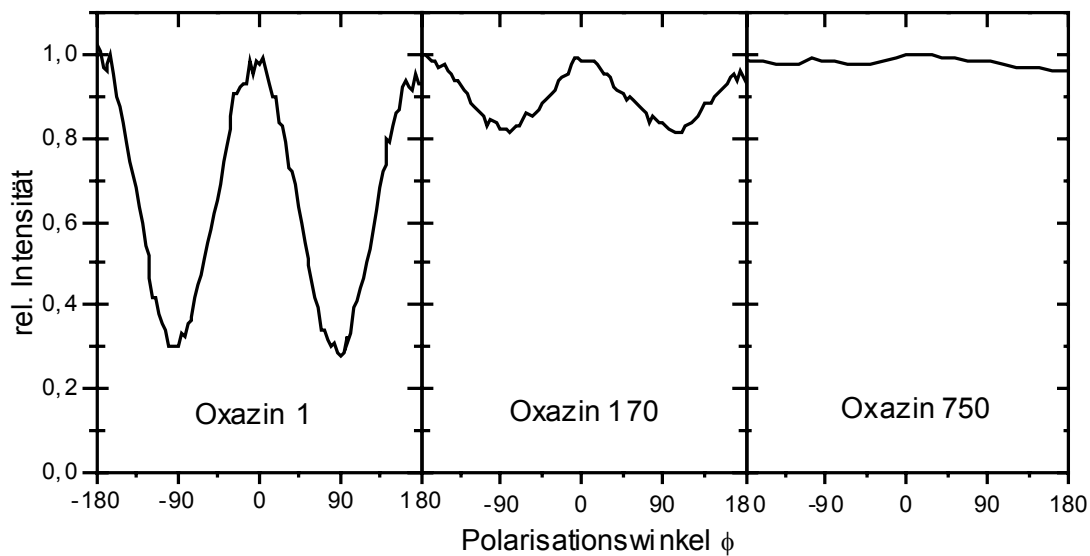


Abbildung 164: Polarisationsabhängige Fluoreszenzintensität von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristallen, die verschiedene Oxazinfarbstoffe enthalten. In der Abfolge der Farbstoffgrößen Oxazin 1 < Oxazin 170 < Oxazin 750 nimmt der Polarisationsverlust zu.

Die Polarisationsrichtung von 0° ist auf die Orientierung der eindimensionalen Poren des $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalls (z-Achse) ausgerichtet. Aus dem Diagrammen ist ersichtlich, daß mit steigender Molekülgröße der Farbstoffe (Oxazin 1 < Oxazin 170 < Oxazin 750) der Polarisationsverlust zunimmt. So ist der Polarisationsverlust von Oxazin 1 nur etwa 30%, von Oxazin 170 etwa 80% und ist bei Oxazin 750 mit 100% vollständig. Unter der Annahme, daß eine gaußförmige Verteilung der Farbstofforientierungen vorliegt, kann aus Abbildung 163 die Breite der Verteilung abgelesen werden. Für Oxazin 1 ergibt sich hier ein Wert von $\beta_{\text{Gauß}} = 25^\circ$, Oxazin 170 streut um $\beta_{\text{Gauß}} = 51^\circ$ und Oxazin 750 ist isotrop verteilt ($\sim 90^\circ$). Im Vergleich zu dem Innendurchmesser der $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Struktur (0,73 nm) sind alle untersuchten Oxazinfarbstoffe (0,87 / 1,0 / 1,1 nm siehe Kapitel 3.1.10) zu groß für einen regulären Einbau. Alle Farbstoffe sitzen in einer Defektstelle des Kristalls, einer sogenannten Mesopore. Dennoch wird eine orientierungsdirigierende Wirkung des $\text{AlPO}_4\text{-5}$ beobachtet. Vermutlich ist diese Mesopore gerade nur so groß, daß das Farbstoffmolekül hineinpaßt, dabei aber möglichst gut entlang der Pore orientiert bleibt. Die Skizze 165 zeigt, wie man sich die Einlagerung der verschieden großen Oxazin Farbstoffmoleküle unter Bildung einer Mesopore vorstellen kann.

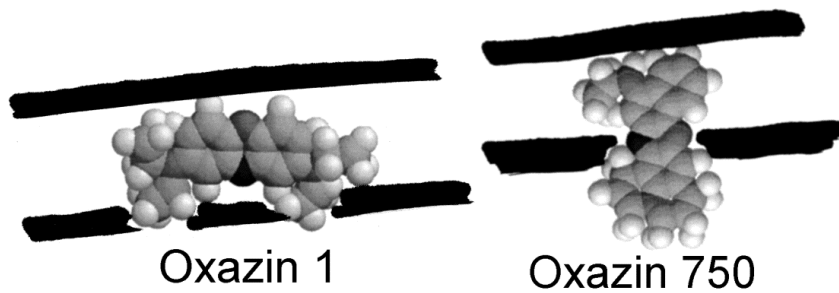


Abbildung 165: Modell für die Einlagerung von Oxazin Farbstoffmolekülen in die Poren von $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Oxazin 1 ist noch relativ gut orientiert, das größere Oxazin 750 dagegen ohne Vorzugsrichtung in eine Defektstruktur eingelagert. Pore und Molekül sind im gleichen Maßstab gezeichnet.

4.5.2 Cy5 MCM41

Das MCM-41 Porensystem, in dem der Farbstoff Cy5 kovalent an die innere Porenwand angebunden wurde, zeigt eine von der Kristallorientierung abhängige Farbstofforientierung. Abbildung 166 zeigt die flachen MCM 41 Kristalle in der Frontansicht mit ihrer sechseckigen Form und in der Seitenansicht.

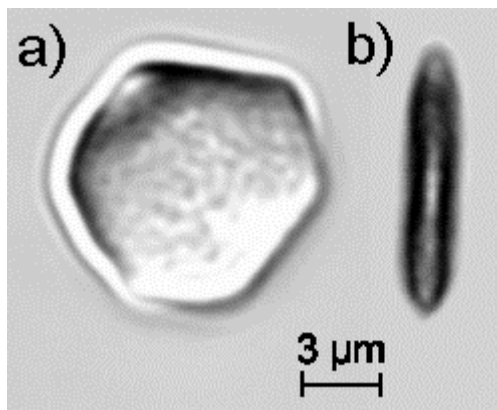


Abbildung 166: Frontansicht a) und Seitenansicht b) der MCM 41 Kristalle. Die Poren verlaufen vermutlich in der Frontansicht a) senkrecht und in der Seitenansicht b) horizontal zur Bildebene.

Schon dies führt zu der Vermutung, daß die eindimensionalen, hexagonal angeordneten Poren entlang der kurzen Kristallachse verlaufen. Absorptionsmessungen zeigen, daß durch die Modifizierung der inneren Porenwände mit Aminogruppen der innere Porendurchmesser von 3 nm auf etwa 2,5 nm geschrumpft ist [Rohlfing]. Dennoch ist die Länge des Cy5 Farbstoffmoleküls mit etwa 2,3 nm etwas kleiner als der Porendurchmesser, weshalb jede beliebige Orientierung aus räumlichen Gründen möglich wäre. Die polarisationsabhängigen Fluoreszenzmessungen der verschiedenen Ansichten unterscheiden sich jedoch erheblich. Die Abbildung 167 zeigt, daß nur dann eine Modulation des Fluoreszenzsignals erhalten wird, wenn der Kristall von der Seite beobachtet wird.

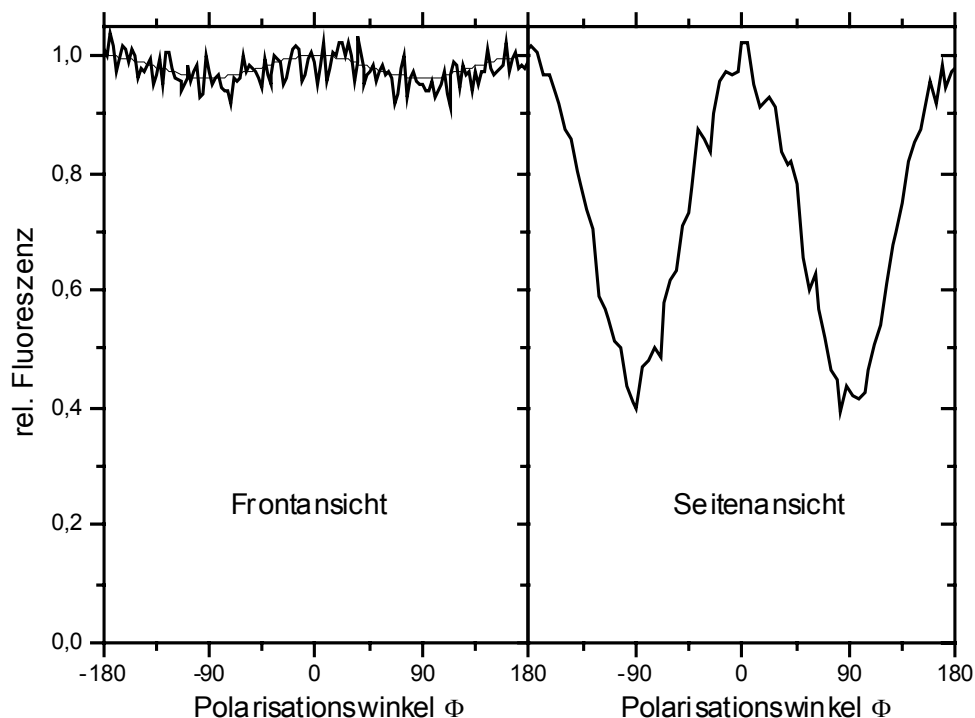


Abbildung 167: Fluoreszenzintensität von Cy5 in MCM-41 in Abhängigkeit von der Anregungspolarisation. Zwischen Front- und Seitenansicht wird ein unterschiedlicher Modulationsverlauf beobachtet.

In der Frontansicht, in der entlang der Porenrichtung gemessen wird, ist der Modulationsverlust nahezu 100%. Da die Poren eine runde oder sechseckige Form besitzen, wird keine bevorzugte Orientierung gefunden. Eine Unterscheidung, ob die Farbstoffmoleküle in einer sechseckigen Pore ausgerichtet sind, ist durch die Messung an vielen Molekülen nicht möglich, da nur in 2 Raumrichtungen unterschieden werden kann.

In der Seitenansicht ist noch etwa 40% der Signalmodulation vorhanden. Die Farbstoffmoleküle sind ungefähr entlang der x-Achse (0° = Horizontal in Abbildung 166 b) orientiert. Da das Übergangsdipolmoment entlang der langen Achse des Farbstoffmoleküls liegt und sich die Moleküle mit ihrer langen Molekülachse eher entlang der Porenrichtung ausrichten, liegen die Poren entlang der kurzen Kristallachse (Horizontal in Abbildung 166 b). Der Modulationsverlust von 40% entspricht nach Abbildung 163, unter der Annahme einer Gaußverteilung, einem Einbauwinkel mit einer Breite von $\beta_{\text{Gauß}} = 31^\circ$.

Durch Bestrahlen der Kristalle mit polarisiertem Licht werden Farbstoffmoleküle mit dieser Orientierung stärker gebleicht als die Moleküle, die senkrecht dazu stehen. Dadurch wird z.B. schon durch die Aufnahme eines Bildes die Gleichverteilung der Frontansicht aufgehoben, weshalb auch in der Frontansicht von Abbildung 167 eine geringe Modulation detektiert wird. An dem Kristall in der Frontansicht wird die horizontale Richtung ausgebleicht. Am Ende der 30 minütigen Bleichphase besitzt das Fluoreszenzbild mit horizontaler Polarisation eine mittlere Intensität von 47 ± 2 Einheiten, während in der vertikalen Richtung noch eine Intensität von 93 ± 2 detektiert wird. Nach einer Wartezeit von zwei Stunden sind die Intensitäten mit 50

bzw. 93 ± 2 Einheiten nahezu unverändert. Die Farbstoffmoleküle sind also unbeweglich, da sich sonst die Intensitäten durch Diffusion angeglichen hätten.

Diese Unbeweglichkeit der Moleküle wurde nicht erwartet, da die kovalente Anbindung über eine flexible Alkylgruppe erfolgt und durch die optische Anregung genügend Energie für Bewegungen vorhanden ist. Möglicherweise ist das PMMA-Polymer, in dem die Kristalle zur Untersuchung eingebettet werden, in die Kristalle eingedrungen und fixiert dadurch die Moleküle. Jedoch zeigen Messungen an Kristallen mit einer flüssigen Einbettung (Glyzerin), daß sich hier das Fluoreszenzsignal im Zeitraum von Stunden auch nur geringfügig erholt. Dafür sind verschiedene Erklärungen denkbar: Zum einen eine Umorientierung der nicht gebleichenen Moleküle, ein photochemisches Erholen der ausgebleichenen Chromophore oder eine geringe Diffusion der gesamten Kristalle in der Lösung. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Einzelmolekülspektroskopie (siehe Kapitel 4.6.3) konnte die Einbettung der Kristalle in Flüssigkeiten nicht weitergehend untersucht werden.

Insgesamt ergibt sich ein Modell (siehe Abbildung 168), in dem die kovalent angebotenen Farbstoffmoleküle mit einer Verteilung von etwa 31° (Gaußmodell) entlang der Pore ausgerichtet sind und stabile Adsorptionsstellen besetzen.

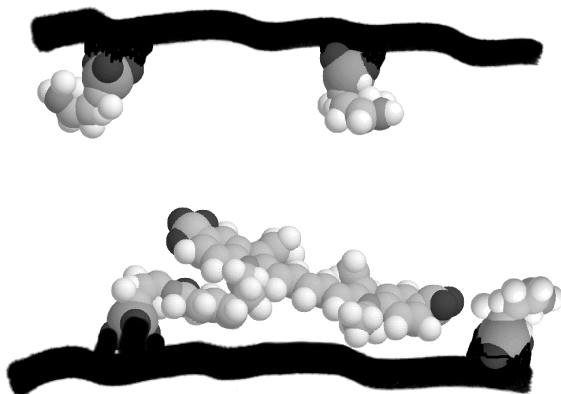


Abbildung 168: Maßstäbliches Modell eines kovalent in die MCM-41 Poren angebotenen Cy5 Farbstoffmoleküls. Die Moleküle besetzen stabile Adsorptionsstellen, die keine Bewegung erlauben. Unter der Annahme einer Gaußverteilung sind die Farbstoffmoleküle mit einer Verteilung von etwa 31° entlang der Pore orientiert. Aufgrund der Modifizierung der Porenwand mit Aminogruppen ist der durchschnittliche innere Porendurchmesser etwas verringert.

4.6 Orientierung einzelner Moleküle

Dieses Kapitel beschreibt die Messungen von Orientierungen einzelner Moleküle. Die Orientierung von linear polarisiertem Licht wird dazu mit Hilfe einer drehbaren $\lambda/2$ Platte, die direkt unter dem Mikroskopobjektiv angebracht ist, kontinuierlich gedreht (siehe Kapitel 2.6.2.5). Da die untersuchten Farbstoffmoleküle ein festes eindimensionales Übergangsdipolmoment besitzen, ist bei einer Polarisationsrichtung senkrecht zum Molekül keine Fluoreszenzanregung möglich.

Moleküle, die entlang der optischen Achse (z) orientiert sind, werden im Zentrum des Anregungsfokus gar nicht, und an dessen Rand etwa 100 mal schlechter angeregt [Ha1999]. In gewöhnlichen Experimenten wird daher nur die Projektion des Übergangsdipolmoments in der Fokalebene detektiert. Da für diese Messungen nur eine $\lambda/2$ Platte zusätzlich in den Strahlengang eingebaut wird, beträgt der Signalverlust der Messung nur wenige Prozent.

4.6.1 TDI in PMMA

Ist das Signal zu Untergrund Verhältnis sehr gut, so kann eine Winkelauflösung von unter einem Grad erreicht werden. In Abbildung 169 ist die polarisationsabhängige Fluoreszenzintensität eines einzelnen TDI Moleküls dargestellt.

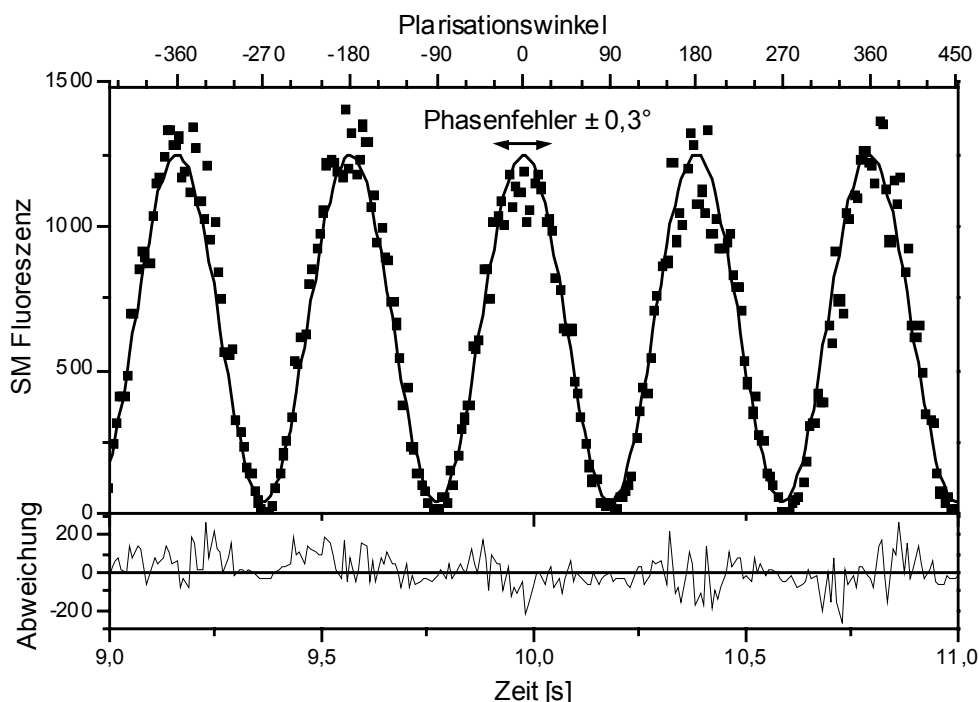


Abbildung 169: Phasenbestimmung am Fluoreszenzsignal eines einzelnen TDI Moleküls. Gezeigt ist ein zwei Sekunden langer Ausschnitt aus einer über 60 Sekunden langen Zeitspur. Die Phase kann hier mit einer Genauigkeit von $0,3^\circ$ bestimmt werden. Die Drehfrequenz der Polarisation beträgt 2,447 Hz.

Der Untergrund der Messung ist so gering, daß bei senkrechter Polarisation das detektierte Signal fast gänzlich verschwindet. Die angepaßte \cos^2 Kurve nach Gleichung (67) kann die Meßdaten sehr gut beschreiben. Die Genauigkeit, mit der die Phase des Signals bestimmt werden kann, beträgt hier weniger als $0,3^\circ$ (Ausgewertet mit dem Programm Origin 6). Etwa mit derselben Genauigkeit kann die aktuelle Orientierung des polarisierten Lichtes im Labor, anhand der Intensität hinter einem Polarisator, mit dem Transmissionsdetektor bestimmt werden. Insgesamt ist somit bei gutem Signal zu Untergrund Verhältnis eine Bestimmung der Richtung des Übergangsdipolmoments eines einzelnen Moleküls mit einer Genauigkeit von unter 1° erreichbar. In der hier verwendeten Anordnung kann die Polarisation nicht allzu schnell gedreht werden, so daß mindestens eine 180° Drehung oder 0,5 Sekunden nötig sind, um die Phase zu bestimmen.

Aber auch bei relativ schlechtem Signal zu Untergrund Verhältnis kann die Phase oft noch auf etwa 5° genau bestimmt werden. Wird mit hoher Anregungsleistung gearbeitet, so sättigt die Fluoreszenzintensität bei parallel polarisierter Anregung. Obwohl in diesem Fall kein \cos^2 förmiger Signalverlauf mehr erhalten wird, sondern das Signal 'oben' abgeflacht wird, ist die Phase auch hier relativ genau bestimmbar. Schwierig bis unmöglich wird die Winkelbestimmung jedoch bei Molekülen, die eine ausgeprägte An-Aus Dynamik im Sekundenbereich besitzen (siehe Abbildung 173).

4.6.2 TDI in PMMA Dynamik

Um zeitliche Änderungen der Orientierung der Übergangsdipolmoments zu bestimmen, wurde ein Computerprogramm in LabView geschrieben, das die gesamte Meßkurve in viele kleine Abschnitte unterteilt, und in jedem die Phasendifferenz zu der Transmissionskurve bestimmt (siehe Anhang 8.5.2.3). Eindeutig sichtbare Umorientierungen können auch durch Absuchen des Datensatzes nach verdächtigen Stellen, Zerteilen an diesen Stellen und Anpassen der \cos^2 Kurven mit dem Programm Origin 6 bestimmt werden.

Als Beispiel soll hier der Frage, ob TDI in PMMA eine geringe Restbeweglichkeit besitzt, nachgegangen werden. Dazu wird eine sehr rauschfreie Messung (ein Ausschnitt ist in Abbildung 169 gezeigt) bestehend aus ca. 300 Drehungen der Polarisation in 15000 sich überlappende Stücke mit je ~ 4 Drehungen zerteilt, und jeweils der Phasenunterschied bestimmt. Zum Ausgleich der Schwankungen der Anpassungsprozedur wird über die 15000 erhaltenen Winkel anschließend ein 4 Polarisationsdrehungen breiter gleitender Mittelwert gebildet. Der dadurch erhaltene Winkelverlauf in Abbildung 170 zeigt Schwankungen um den Mittelwert, die über der erwarteten Genauigkeit von $0,3^\circ$ liegen.

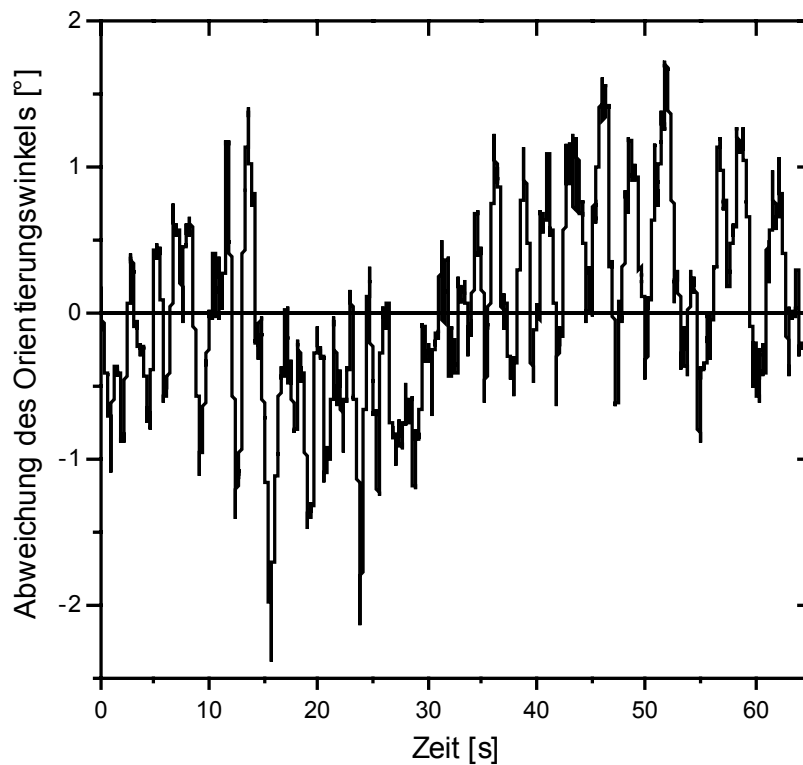


Abbildung 170: Zeitliche Winkeländerung des TDI-Moleküls in PMMA. Der Orientierungswinkel schwankt $\sim 0,7^\circ$ um den Mittelwert, der auf 0° gesetzt wird.

Die Richtung des Übergangsdipolmoments schwankt demnach geringfügig mit der Zeit. Eine Autokorrelationsanalyse der zeitlichen Winkeländerung ist in Abbildung 171 dargestellt. Das Wackeln des Moleküls besitzt demnach eine charakteristische Amplitude von $0,35^\circ$ in einer Zeit von 12 Sekunden.

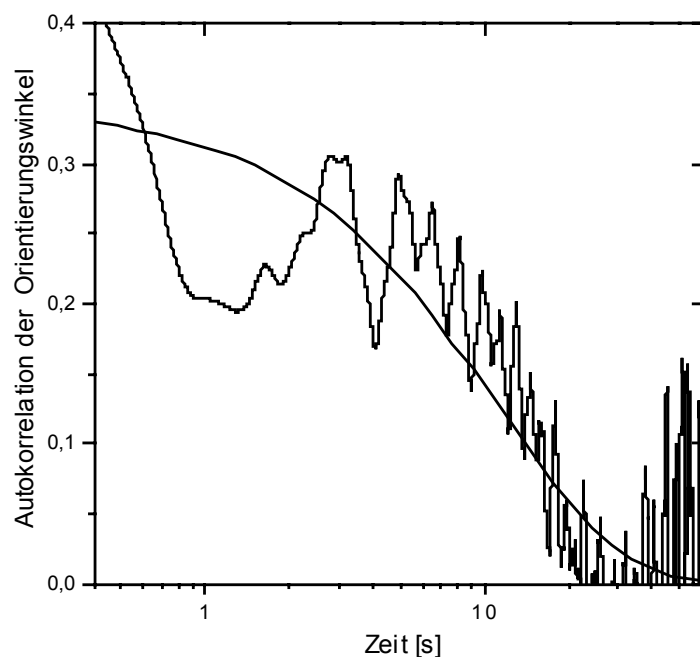


Abbildung 171: Autokorrelationsanalyse der Orientierungswinkel. Die angepasste Exponentialfunktion (glatte Kurve) ergibt eine Fluktuation des Winkels im Zeitraum von 12 Sekunden.

4.6.3 Cy5 in MCM 41

Bereits durch Messungen an vielen Molekülen (siehe Kapitel 4.5.2) ist gezeigt worden, daß Cy5 Moleküle, die kovalent an die innere Wand von MCM 41 Poren angebunden wurden, eine schwach bevorzugte Orientierung entlang der Porenrichtung aufweisen. Obwohl die kovalente Bindung eine freie Rotation erlauben würde, sind die Orientierungen der Farbstoffmoleküle zeitlich stabil. Der Farbstoff Cy5 ist zwar nicht besonders photostabil, besitzt aber einen sehr großen Extinktionskoeffizienten, so daß bei sehr geringer Anregungsleistung gearbeitet werden kann. Die Messungen der Orientierung einzelner Cy5 Moleküle wird an zwei verschieden orientierten Kristallen durchgeführt. In der Frontansicht wird die Ebene senkrecht zu den hexagonal angeordneten Poren detektiert. In einem konfokalen Schnitt von der Seite (siehe Abbildung 172) liegt die Ausbreitungsrichtung der Poren entlang der kurzen Kristallachse.

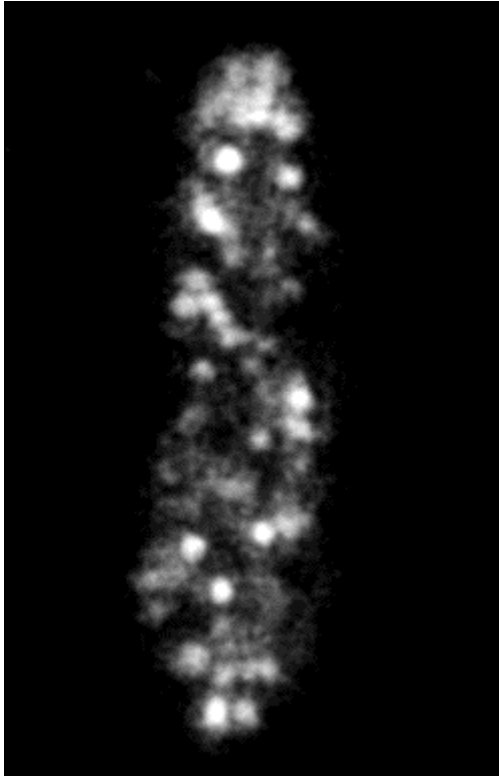


Abbildung 172: Einzelne Cy5 Farbstoffmoleküle, deren Orientierung bestimmt wird, in einem MCM 41 Kristall, der von der Seite beobachtet wird. Die Poren des Kristalls verlaufen in horizontaler Richtung entlang der kurzen Kristallachse.

Bei etwa der Hälfte aller in der Abbildung detektierten Punkte ist es möglich, die Orientierung des Übergangsdipolmoments einzelner Moleküle zu bestimmen. In der anderen Hälfte liegen entweder mehrere Moleküle zu nahe beieinander oder deren Überlebensdauer liegt unter einer Sekunde, was für die Winkelbestimmung nicht ausreicht. Bei der Aufnahme des Bildes, das für die Auswahl der einzelnen Moleküle notwendig ist, werden sicher einige Moleküle ausgeblendet. Um die statistische Auswertung nicht zu zerstören, wird das Bild mit einer Anregungspolarisation von etwa 45° schräg zur Kristallausdehnung aufgenommen. Ein Beispiel für eine typische Polarisationsspur ist in Abbildung 173 dargestellt. Das Fluoreszenzsignal des einzelnen Cy5 Moleküls schwankt stark. So ist das Molekül z.B. bei 17,5 s kurzzeitig in einem Auszustand, etwas später bei 22 s ist es dagegen besonders hell.

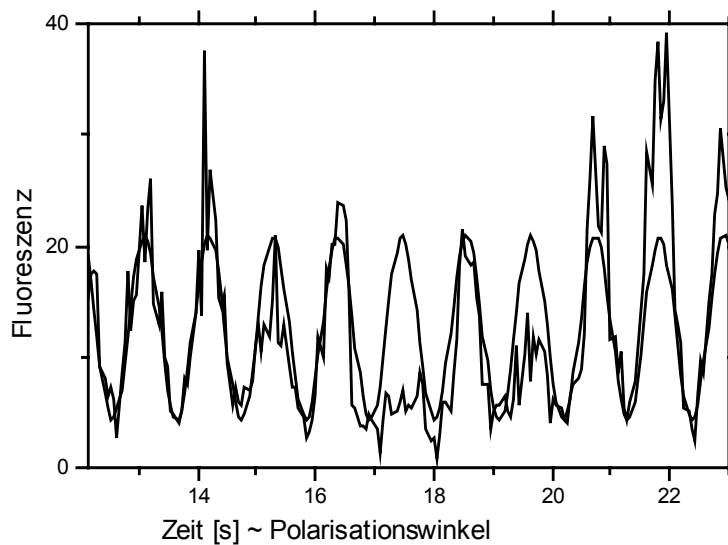


Abbildung 173: Typischer Fluoreszenzintensitätsverlauf von Cy5 in MCM 41 bei rotierender Anregungspolarisation. Mit der Anregungsleistung von etwa $0,4 \mu\text{W}$ werden bei optimaler Polarisation etwa 10000 bis 50000 Photonen pro Sekunde detektiert. Die glatte Kurve ist die angepaßte \cos^2 Funktion nach Gleichung (67).

Trotz dieser Schwankungen kann die Phase des Signals auf etwa $1,3^\circ$ genau bestimmt werden. Abbildung 174 zeigt die Orientierungswinkel und das Histogramm von 26 einzelnen Molekülen.

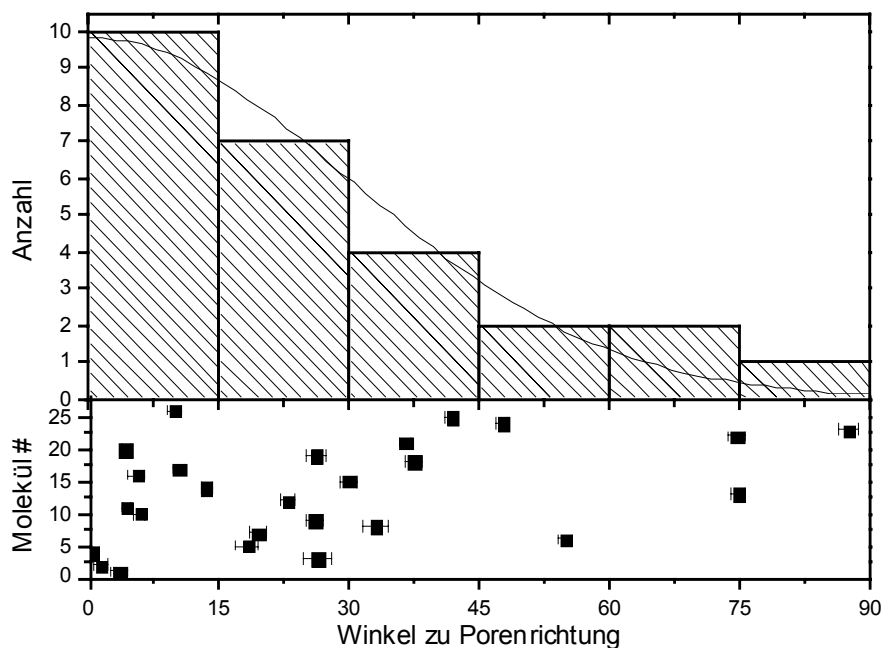


Abbildung 174: Orientierungswinkel (unten) und deren Histogramm (oben) von Cy5 in MCM 41. Die Moleküle wurden in der Seitenansicht des Kristalls detektiert. Der Winkel von 0° entspricht der Porenrichtung. Die durchgezogene Linie entspricht einer Gaußverteilung mit einer halben Halbwertsbreite von $34 \pm 2^\circ$.

Die Moleküle sind etwa in einer gaußförmigen Verteilung entlang der Porenrichtung (0° = kurze Kristallachse in Abbildung 172) ausgerichtet. Die halbe Halbwertsbreite der Verteilung beträgt $34 \pm 2^\circ$. Dies steht in guter Übereinstimmung mit einer Messung an vielen Molekülen (siehe Kapitel 4.5.2), bei der unter Annahme einer gaußförmigen Winkelverteilung ein Verteilungswinkel von $\sim 31^\circ$ gefunden wird. Die Form der Verteilungsfunktion kann jedoch nur durch die Einzelmoleküluntersuchung aufgeklärt werden.

Auch in der Frontansicht können einzelne Cy5 Moleküle detektiert werden (siehe Abbildung 125 c). Von etwa 30 durchgeführten Orientierungsmessungen wurden jedoch nur 8 Orientierungswinkel erhalten. Hauptproblem ist hier das schnelle Ausbleichen in unter einer Sekunde. Abbildung 175 zeigt die 8 Orientierungswinkel, die etwa ein Vielfaches von 60° betragen.

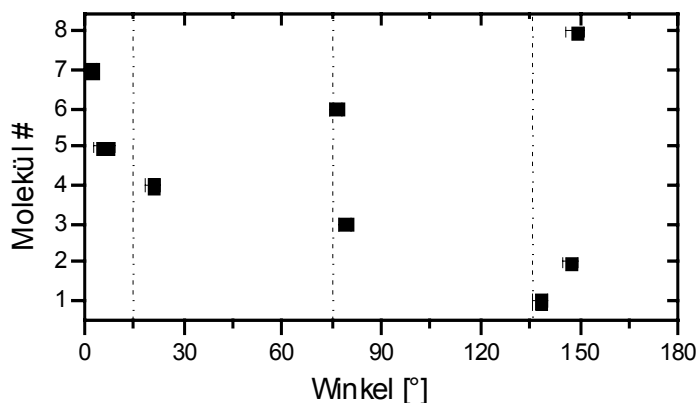


Abbildung 175: Orientierungswinkel von einzelnen Cy5 Molekülen in der Frontansicht der MCM 41 Kristalle. Die Winkel mit einem Vielfachen von 60° weisen auf die Kanten des sechseckigen Kristallplättchens.

In Abbildung 176 ist die Orientierung der Moleküle im Vergleich zur Orientierung des Kristalls dargestellt.

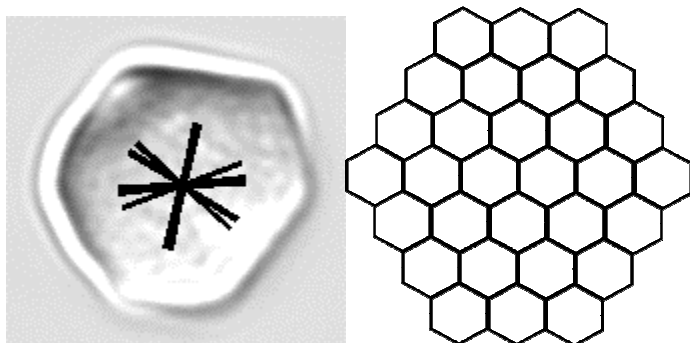


Abbildung 176 (Links): Orientierung von 8 einzelnen Cy5 Molekülen in der Frontansicht eines MCM-41 Kristalls. Die hexagonalen Poren besitzen eine um 60° gedrehte Orientierung gegenüber der äußeren Kristallform (rechts). Daher sind die Moleküle bevorzugt auf die Ecken der hexagonalen Porenstruktur orientiert.

Da die innere Struktur der Poren um 60° gegenüber der äußeren Form des Kristalls gedreht ist, sind die Moleküle auf die Ecken der hexagonalen Poren ausgerichtet. An 2 weiteren Kristallen konnte dieses Verhalten nicht eindeutig reproduziert werden, was aber auch an der leider sehr unregelmäßigen Form dieser Kristalle liegen kann. Durch Messungen an einem Ensemble von Molekülen kann eine bevorzugte Orientierung unmöglich untersucht werden, da die Polarisation nur in 2 Raumrichtungen unabhängig bestimmt werden kann. Andere strukturaufklärende Methoden, wie die Röntgenstrukturanalyse, benötigen sehr große Konzentrationen, die sich in diese Proben nicht einbauen lassen.

In keiner einzigen Messung wird eine Umorientierung um die eigentlich relativ bewegliche kovalente Anbindung der Cy5 Moleküle beobachtet. Dieses Verhalten kann auch an den mit viel Farbstoff belegten Proben bestätigt werden, wie die Bleichexperimente in Kapitel 4.5.2 zeigen.

4.6.4 Cy5 in MCM 41, Einbettung in Lösungsmitteln

Auch durch die Zugabe verschiedener Lösungsmittel (Ethylenglykol, Glycerin, Tetradekan) wird keine eindeutige Rotationsbewegung in der Probe beobachtet, wie dies für einen kovalent angebondenen Farbstoff erwartet werden kann. Jedoch bleichen und blinken die Farbstoffmoleküle durch die Lösungsmittelzugabe noch stärker. Abbildung 177 zeigt eine Orientierungsmessung von einem einzelnen Cy5 Molekül in MCM 41, das in Glycerin eingebettet wurde.

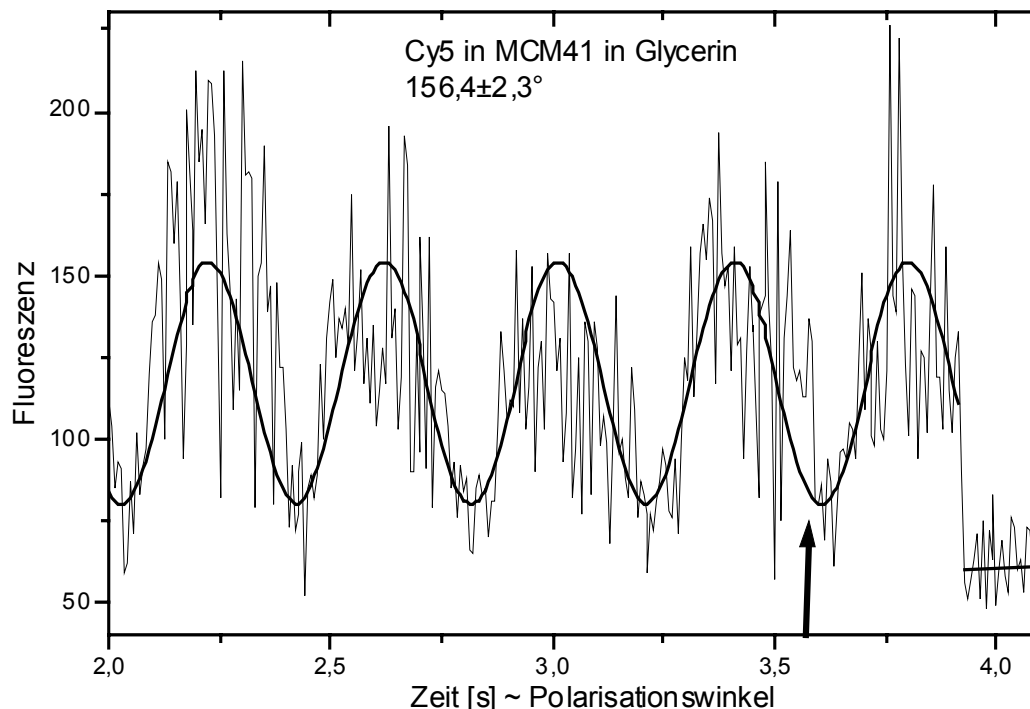


Abbildung 177: Fluoreszenzintensitätsverlauf von einem Cy5 Molekül in MCM 41 in Glycerin. Durch die Einbettung des Kristalls in Glycerin blinken und bleichen die Farbstoffmoleküle sehr stark. Die glatte Kurve ist die angepasste \cos^2 Funktion nach Gleichung (67).

Über die gesamte Lebensdauer von etwa 4 Sekunden ist keine eindeutige Änderung der Phase erkennbar. Andeutungen einer geringen Bewegung sind jedoch vorhanden. Dies sind nicht die Stellen, an denen ungewöhnlich wenig Intensität detektiert wird, da auch Blinken dies verursachen kann, sondern die Stellen, an denen die Polarisationsrichtung eigentlich ein schwaches Signal erwarten läßt, aber trotzdem ein relativ starkes Signal vorhanden ist. Die Stelle bei 3,6 Sekunden in Abbildung 177 ist solch ein Hinweis, der für genauere Aussagen jedoch viel zu kurzlebig ist.

Insgesamt ergibt sich das Bild, daß die Cy5 Farbstoffmoleküle relativ stabile Adsorptionsstellen an der Porenwand besetzen.

4.6.5 Oxazin in $\text{AlPO}_4\text{-5}$

Wie schon in Kapitel 4.3.2.1 gezeigt, können einzelne Oxazinfarbstoffmoleküle, die während der Synthese in die Poren von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ eingeschlossen wurden, detektiert werden. In diesem Abschnitt soll aus den Orientierungsmessungen an einzelnen Molekülen die Form der Verteilungsfunktion der Orientierungen bestimmt werden. Dazu wurden drei verschieden große Oxazin Farbstoffe in geringer Konzentration in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle eingelagert. Alle drei Farbstoffmoleküle sitzen in Defektstrukturen, da die Abmessungen der Moleküle über denen der Pore liegt. Das schmäliste Molekül ist Oxazin 1, das mit einer Höhe von 0,87 nm die Abmessungen der Poren von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ von 0,73 nm nur knapp überschreitet. Die Farbstoffmoleküle Oxazin 170 und Oxazin 750 sind jedoch mit 1,0 und 1,1 nm einiges größer als der Porendurchmesser.

Abbildung 178 zeigt den Signalverlauf in einer typischen Polarisationsmessung von Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$.

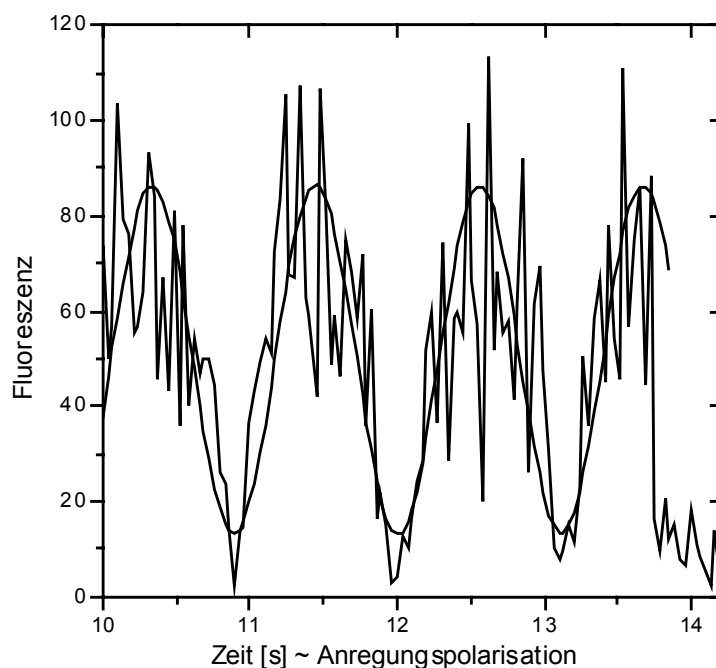


Abbildung 178: Typisches Fluoreszenzsignal von Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ bei variabler Anregungspolarisation. Bei 13,8 s bleicht das Molekül plötzlich.

Im Vergleich zu den Messungen an Cy5 in MCM 41 ist das Fluoreszenzsignal der Oxazine zeitlich stabiler. Die Oxazinmoleküle zeigen nur selten ein Blinken auf der Sekundenzeitskala. Auch die Photostabilität ist etwas besser. So liegt die Meßzeit bis zum Bleichen der Oxazin 1 Moleküle bei etwa 20 Sekunden (11 μ W Anregungsleistung bei 633 nm, NA 1,3). Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute (besonders Oxazin 1) und der ungünstigen Anregungs- und Detektionswellenlänge (besonders Oxazin 170) ist das Signal zu Untergrund Verhältnis jedoch etwas schlechter als bei Messungen an Cy5 oder gar TDI.

Es werden etwa so viele einzelne Molekülorientierungen bestimmt, bis in den Histogrammen der Orientierungswinkel klare Verteilungen erkennbar sind. Alle Winkel sind auf die Orientierung der eindimensionalen Porenrichtung der $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalle bezogen. Da bei den kleinen $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristallen die Lage der Kristallachse oft nur schwer unterscheidbar ist (siehe Abbildung 75), wurden nur eindeutige Kristalle vermessen, bei denen eine glatte Seite (entlang der Porenrichtung) und eine runde Seite (Kristallenden) unterscheidbar sind. Die Kristallorientierung kann je nach Kristall mit einer Genauigkeit von etwa $1\text{-}3^\circ$ bestimmt werden.

Für Oxazin 1 ergibt sich aus den Winkeln von 49 einzelnen Molekülen eine deutliche Verteilung (siehe Abbildung 179), die gut mit einer Gaußfunktion nach Gleichung (93) beschreiben werden kann.

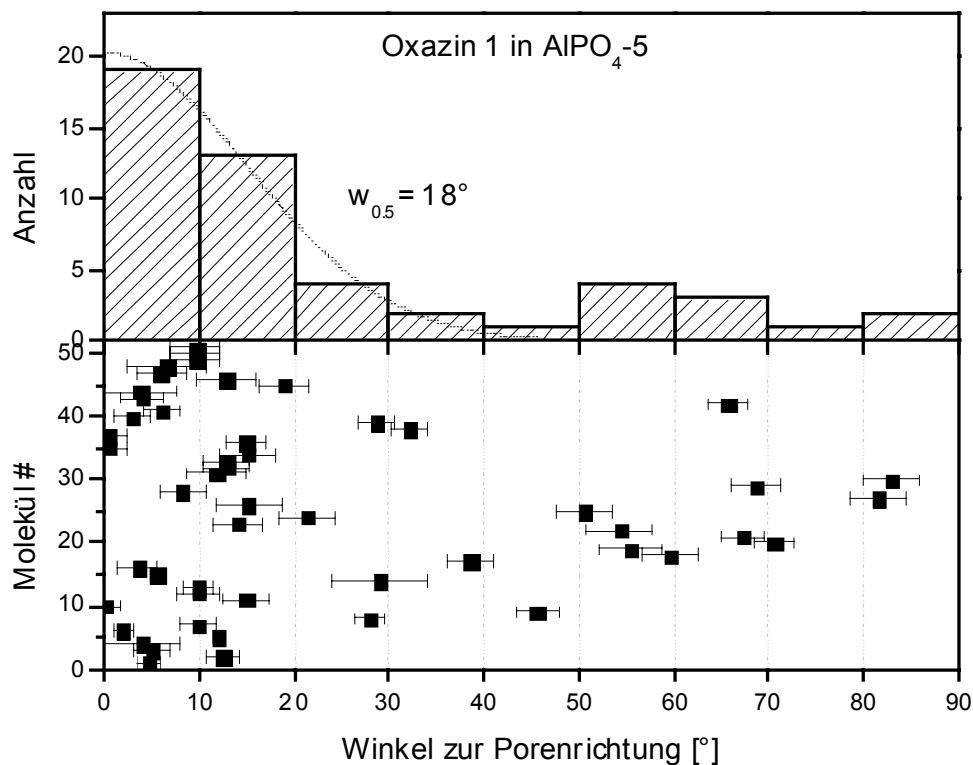


Abbildung 179: Histogramm (oben) und die einzelnen Orientierungen (unten) von einzelnen Oxazin 1 Molekülen in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Die angepaßte Gaußkurve nach Gleichung (93) besitzt eine halbe Halbwertsbreite von $18 \pm 1^\circ$.

Die halbe Halbwertsbreite der Gaußkurve liegt mit $18\pm 1^\circ$ aber etwa unter dem in Kapitel 4.5.1 bei Messungen mit vielen Molekülen abgeschätzten Wert von $\beta_{\text{Gauß}} = 25^\circ$.

Für das größere Oxazin 170 ergibt sich aus 26 einzelnen Molekülen eine Verteilung (siehe Abbildung 180) die in guter Näherung mit einer Gaußfunktion nach Gleichung (93) beschreiben werden kann.

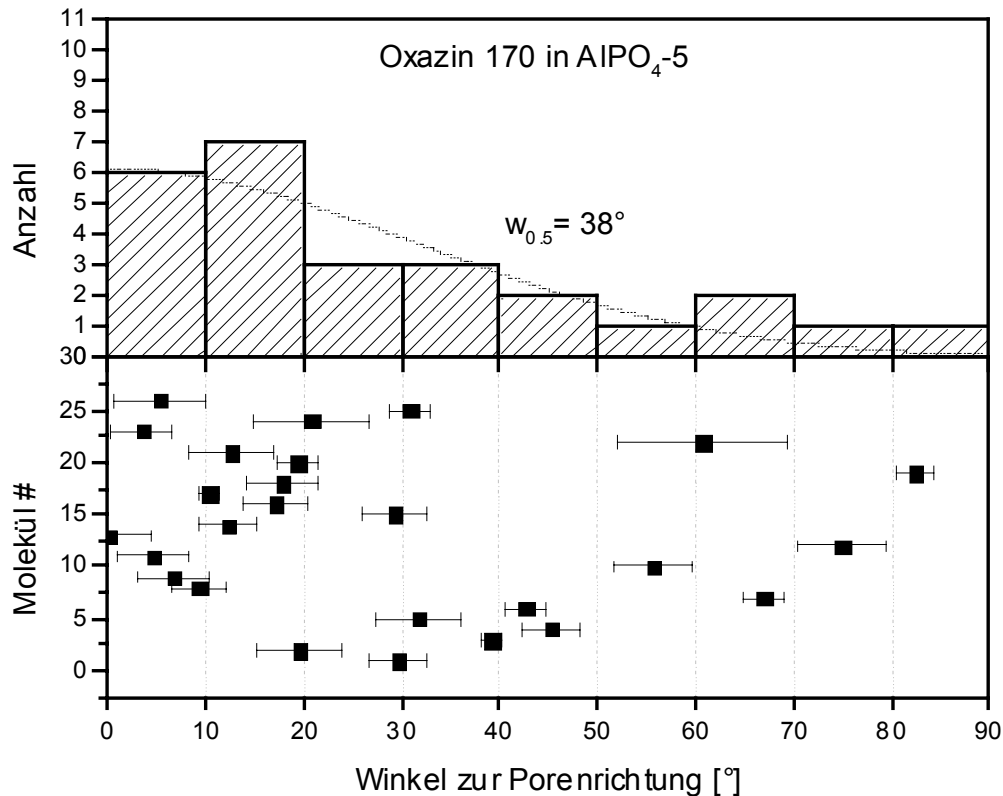


Abbildung 180: Histogramm (oben) und die einzelnen Orientierungen (unten) von 26 einzelnen Oxazin 170 Molekülen in AlPO₄-5. Die angepasste Gaußkurve nach Gleichung (93) besitzt eine halbe Halbwertsbreite von $38\pm 4^\circ$.

Auch für Oxazin 170 ist die halbe Halbwertsbreite der Gaußkurve mit $38\pm 4^\circ$ einiges unter der in Kapitel 4.5.1 bei Messungen mit vielen Molekülen abgeschätzten Breite von $\beta_{\text{Gauß}} = 51^\circ$.

Bei Oxazin 750 ist auch nach über 50 einzelnen Molekülen nur eine gleichmäßige Verteilung (siehe Abbildung 181) bestimmbar. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Bestimmung an vielen Molekülen bei der keine bevorzugte Orientierung beobachtet wird.

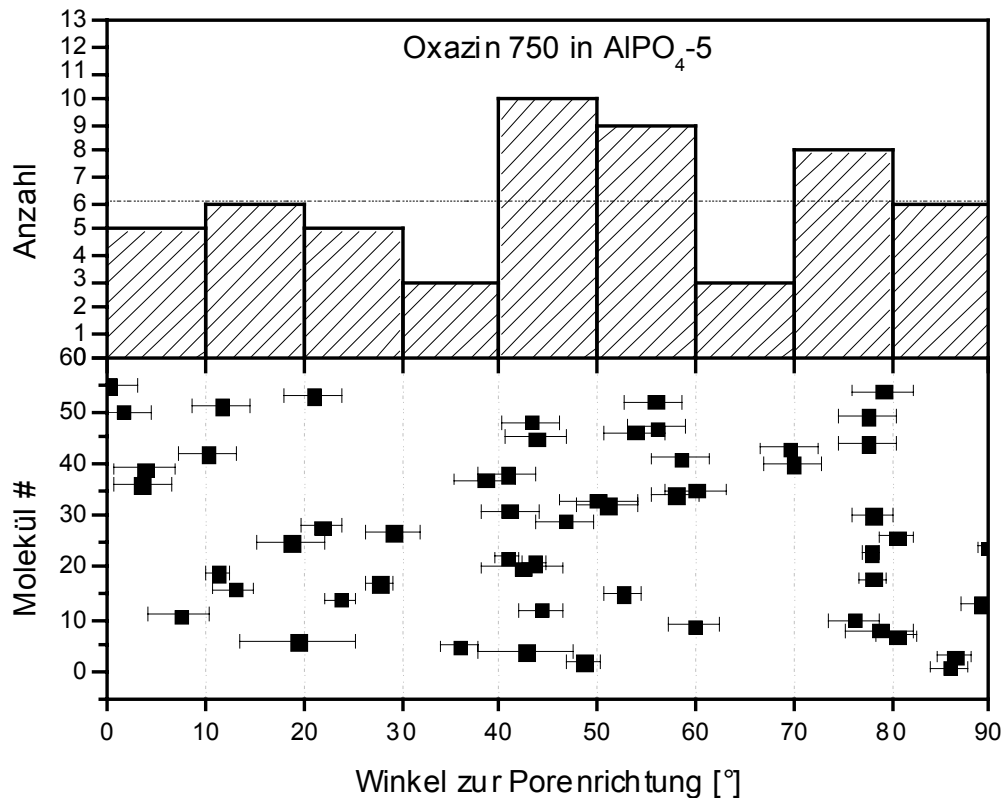


Abbildung 181: Histogramm (oben) und die einzelnen Orientierungen (unten) von 56 einzelnen Oxazin 750 Molekülen in AlPO₄-5. Die horizontale gestrichelte Kurve im Histogramm stellt der Mittelwert von 6,2 Ereignissen pro 10° für eine gleichmäßige Verteilung dar.

Im einfachstem Modell besitzt der Farbstoff eine verkippte Einbaulage in der Pore. Dadurch würde sich aber eine Winkelverteilung mit einem maximalen Winkel ergeben. Die hier bestimmten Verteilungsfunktionen von Oxazin 1 und Oxazin 170 in AlPO₄-5 sind jedoch sicher keine Stufenfunktionen oder nach oben beschränkte Verteilungen, wie sie in diesem Fall erwartet werden. Vielmehr werden gaußförmige Verteilung gefunden, die ein statistisches Einbauverhalten nahelegen. In dem Gauß-Modell sind alle Einbauwinkel möglich, jedoch werden Lagen entlang der Porenrichtung je nach der Größe des Moleküls mehr oder weniger bevorzugt. Interessant für die Zukunft wäre eine Probe mit eindeutig schlankeren Molekülen, bei der eine Stufenfunktion auftreten könnte.

4.6.6 Oxazin in AlPO₄-5 Orientierungsdynamik

In zwei von 49 erfolgreichen Messungen zeigt Oxazin 1 in AlPO₄-5 eine Änderung der Orientierung während der Meßzeit. Die Umorientierung ist an einem klaren Phasenshift des Fluoreszenzsignals bei rotierender Anregungspolarisation erkennbar. Abbildung 182 zeigt eine Messung, in der ein Oxazin 1 Molekül nach 5,9 s von einer Orientierung 49,5±2° zur Kristallachse auf -29±5° springt.

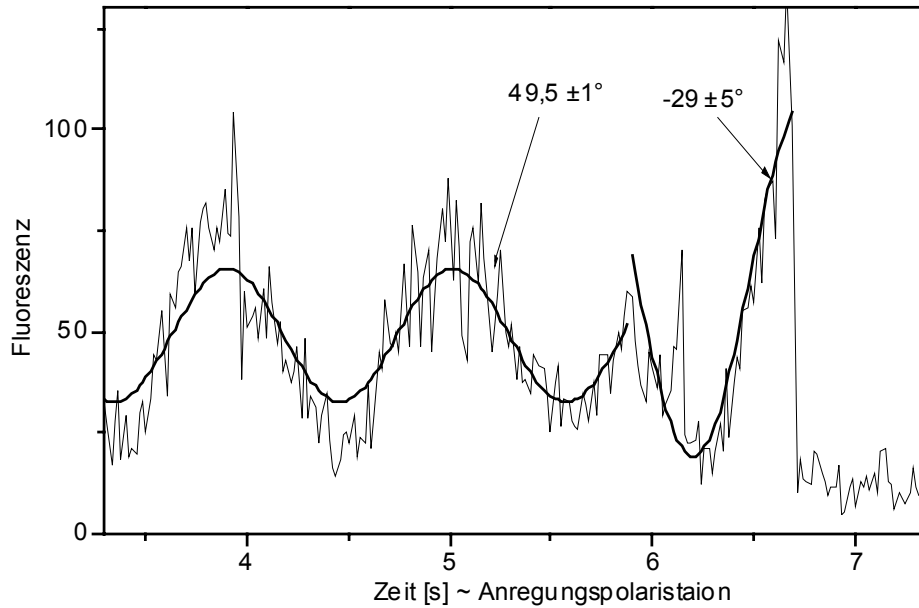


Abbildung 182: Phasensprung in der Fluoreszenzintensität von Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ bei variabler Anregungspolarisation. Der Phasensprung entspricht einer Umorientierung von $49,5 \pm 1^\circ$ auf $-29 \pm 5^\circ$ relativ zu Porenrichtung.

In der geänderten Orientierung ist die Fluoreszenzintensität einiges stärker als zuvor, was durch eine verbesserte Orientierung in die Fokalebene oder geänderte Fluoreszenzraten erklärt werden kann. Abbildung 183 zeigt den zeitlichen Verlauf der Orientierungswinkel der beiden sich umorientierenden Moleküle.

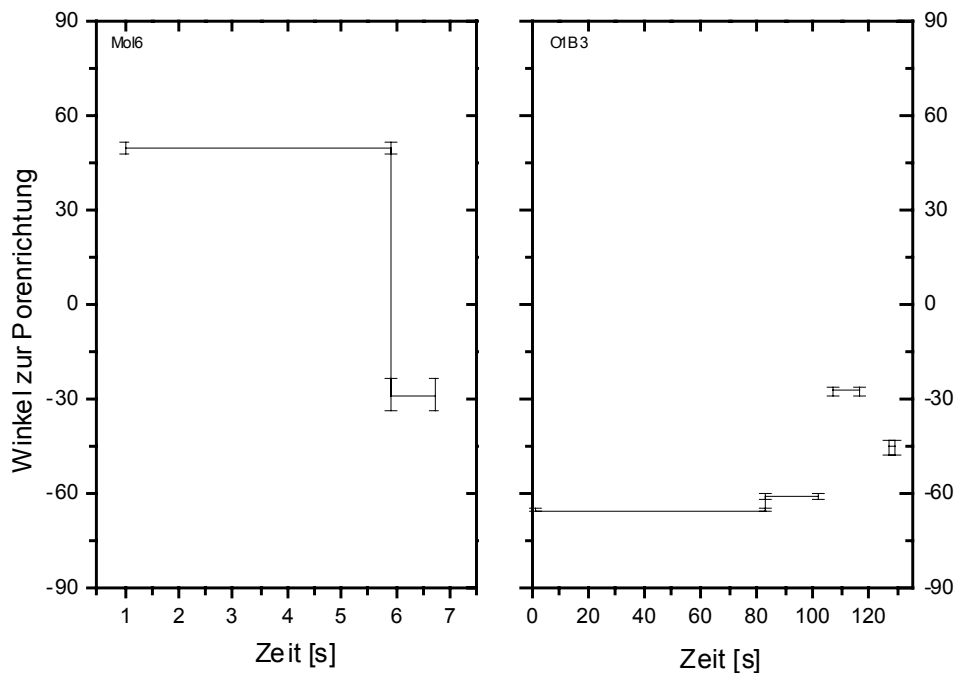


Abbildung 183: Zeitlicher Verlauf der Orientierung relativ zur Porenrichtung von zwei Oxazin 1 Molekülen. Das Molekül rechts war zwischen den beiden letzten Umorientierungen kurz in einem Dunkelzustand.

Die Winkel der beiden beweglichen Moleküle sind im Vergleich zu den anderen (siehe Abbildung 179) relativ groß, so daß die Vermutung nahe liegt, daß sich die beweglichen Moleküle in einer größeren Defektstruktur des Kristalls befinden. Abbildung 184 zeigt die Position und Orientierungswinkel des einen sich umorientierenden Moleküls neben anderen lagestabilen Molekülen im $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristall.

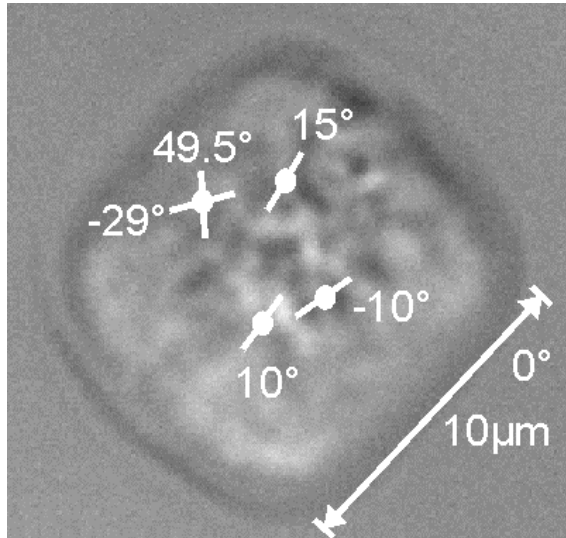


Abbildung 184: Transmissionsbild eines $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristalls mit den Positionen und Orientierungen von 4 Oxazin 1 Molekülen. Das Molekül links oben dreht seine Orientierung in Verlauf der Messung von $49,5^\circ$ nach -29° . Die Pfeil rechts unten gibt die Orientierung der Poren im Kristall an.

4.6.7 TDI im Monolith

Durch die Synthese mit einem Flüssigkristall konnten sehr große, glasartige Stücke eines mesoporösem M41S Festkörpers (Monolith) hergestellt werden. In diesem konnten neben vielen diffundierenden TDI Molekülen zu etwa 10% auch immobile Moleküle beobachtet werden (siehe Kapitel 4.4.7). An solchen, nicht frei diffundierenden Molekülen, werden hier Orientierungsuntersuchungen durchgeführt. Dabei werden in einem etwa $20\ \mu\text{m}$ großen Bereich die Orientierungswinkel von etwa 20 Molekülen bestimmt. Wie aus dem Histogramm in Abbildung 185 ersichtlich ist, sind die immobile Moleküle in diesem $20\ \mu\text{m}$ großen Bereich nicht in einer Vorzugsrichtung orientiert. Aus den Diffusionsmessungen in Kapitel 4.4.7 konnte schon eine starke Verknäulung der eindimensionalen Porenstruktur beobachtet werden.

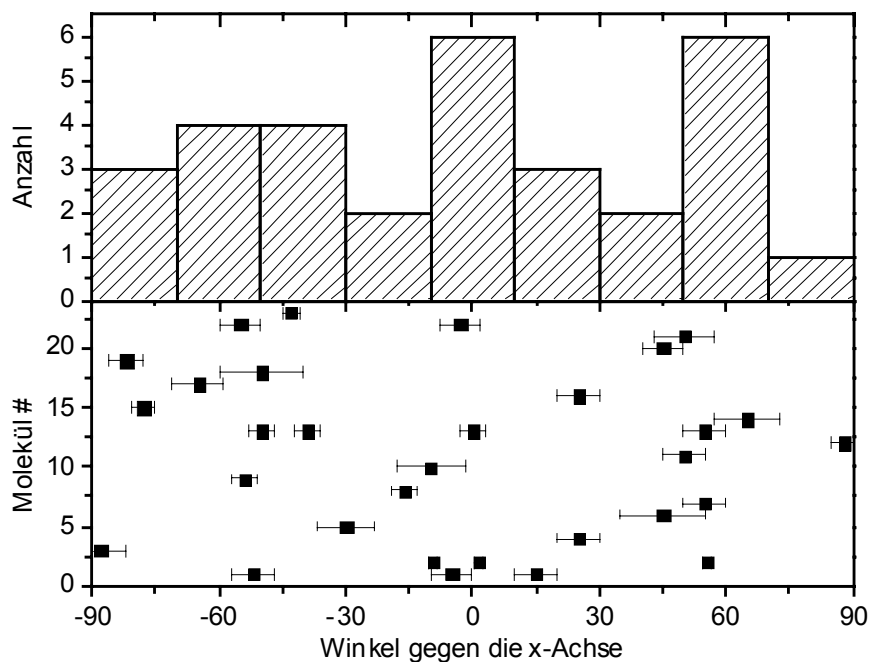


Abbildung 185: Histogramm (oben) und die einzelnen Orientierungen (unten) von 24 einzelnen TDI Molekülen im M41S Monolith.. Keine Vorzugsrichtung der immobilen TDI-Moleküle wird beobachtet. Vermutlich sind die Poren stark verknäult.

Bei drei Polarisationsmessungen kann die Phase nicht eindeutig bestimmt werden, da die Moleküle sich schneller als die Drehung der Polarisation umorientieren. In Abbildung 186 ist ein Beispiel eine solchen schnellen Rotationsbewegung gezeigt.

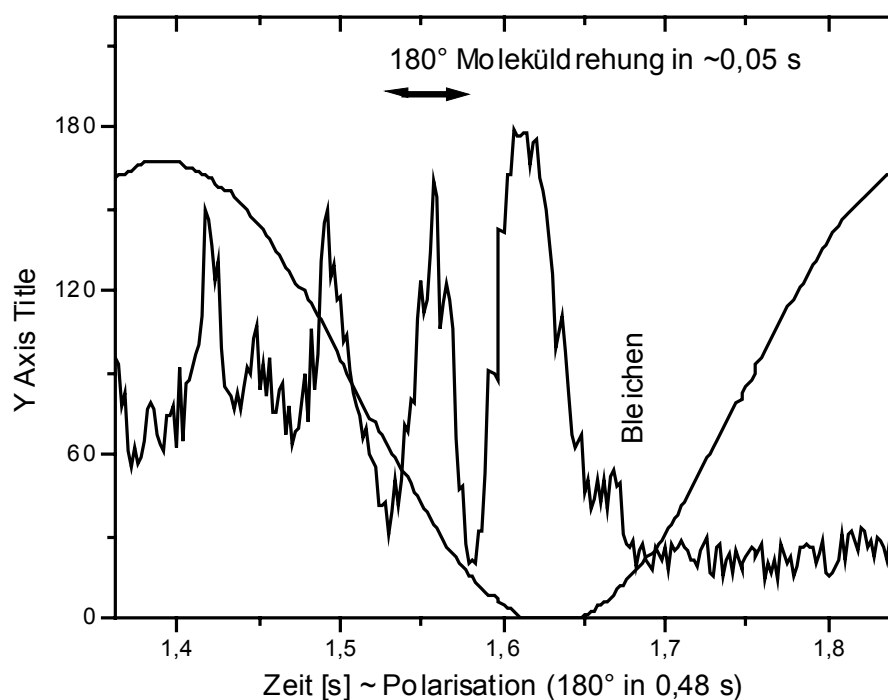


Abbildung 186: Schnelle Drehung eines TDI Moleküls im MCM-41 Monolith.

Das Fluoreszenzsignal ist nicht mit der Drehung der Anregungspolarisation korreliert, sondern schwankt in einem kürzeren Zeitabstand.

Bei drei weiteren Messungen ändert sich die Phase im Verlauf der Untersuchung eindeutig. Abbildung 187 zeigt den Winkelverlauf der längsten Spur. Bei den beiden anderen konnten gleichzeitig die Fluoreszenzspektren detektiert werden, weshalb diese in Kapitel 4.9.2.1 dargestellt werden.

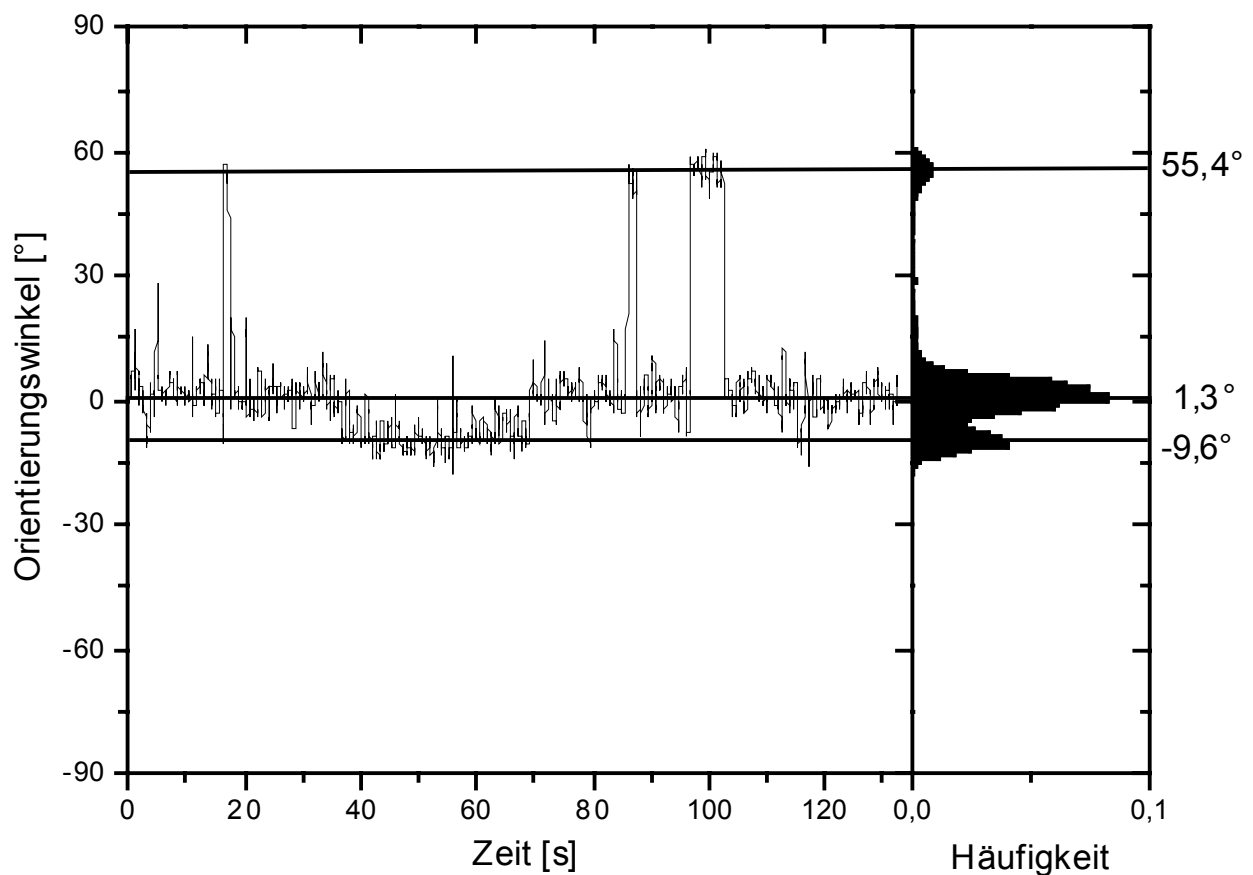


Abbildung 187: Zeitlicher Verlauf des Orientierungswinkels eines einzelnen TDI Moleküls in mesoporösem MCM-41. Auf der rechten Seite ist das Histogramm aller bestimmten Orientierungswinkel angegeben.

Drei stabile Einbaulagen sind erkennbar, die durch plötzliche Umorientierungen besetzt werden. Als bevorzugte Orientierungen wird ein Winkel von 1,3° gefunden, der zeitweise nach 55,4° oder -9,6° wechselt.

Insgesamt ergibt sich ein sehr differenziertes Bild der immobilen TDI Moleküle im mesoporösem MCM-41. Einerseits wird erwartet, daß das wasserunlösliche TDI sich nur innerhalb des hydrophoben Teils des Flüssigkristalls im Inneren der Mizellen aufhält, wo eine hohe Beweglichkeit vorliegen sollte. Andererseits zeigen die Messungen, daß neben den beweglichen Molekülen auch einige Moleküle stabile Einbaulagen besetzten. Vermutlich ist hier die mesoporöse Struktur so deformiert, daß das Farbstoffmolekül eingeklemmt wird. Der Einbau der immobilen TDI Moleküle in die MCM-41 Pore kann nach dem Modell in Abbildung 188 dargestellt werden.

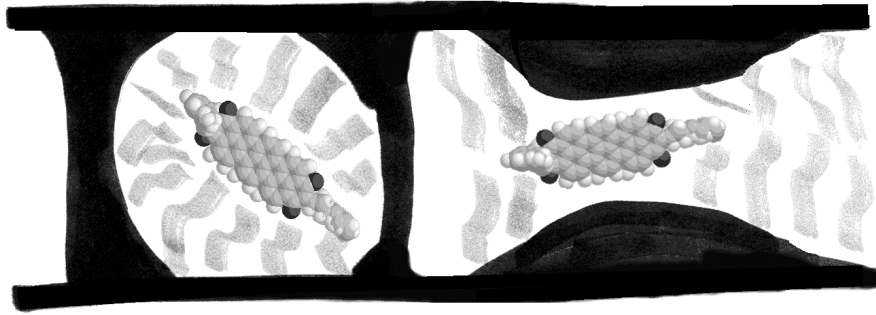


Abbildung 188: Modell für die Einbaulage der immobilen TDI Moleküle in der MCM-41 Pore. Das linke Molekül ist in einem verstopften Kanal, wodurch die Translation zwar verhindert wird, eine Rotation in der Tensidumgebung aber noch möglich ist. Das rechte Molekül dagegen ist in der Silikatstruktur eingeklemmt und besitzt daher auch eine fixe Orientierung.

Einige Moleküle können sich noch etwas bewegen und sind vermutlich in einer verstopften Pore (Abbildung 188 links). Die meisten Moleküle können sich jedoch nicht einmal mehr umorientieren und sind daher vermutlich in verengten Poren eingeklemmt (Abbildung 188 rechts).

4.6.8 TDI - UTD-1 Orientierungen

Durch eine spezielle Fluoridsynthese werden große UTD-1 Kristalle erhalten, die kalziniert und anschließend mit TDI Farbstoff behandelt werden. Nach dem Waschen der Kristalle können einzelne TDI Moleküle im Inneren eines Kristallits detektiert werden (siehe Kapitel 4.3.2.4). Die Orientierungswinkel der einzelnen Moleküle sind in Abbildung 189 eingezeichnet.

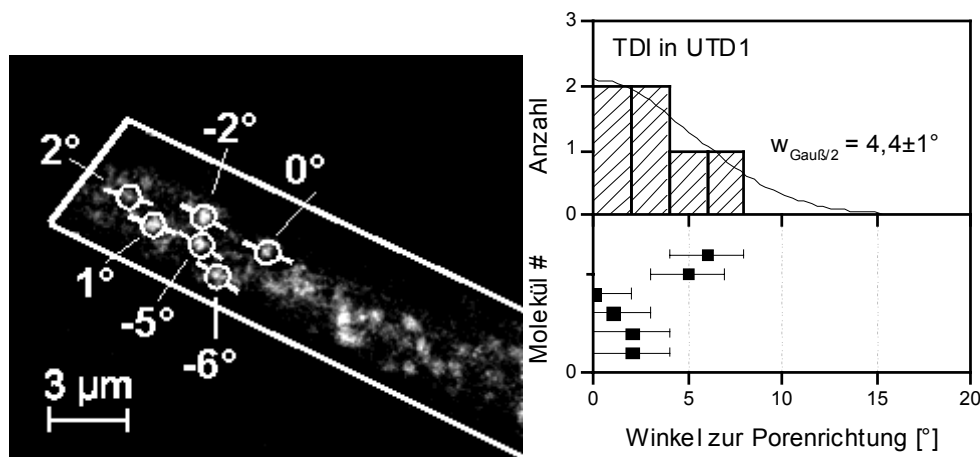


Abbildung 189 (links): Konfokales Fluoreszenzbild einzelner TDI Moleküle in UTD1. Zusätzlich sind die Orientierungen der einzelnen Moleküle und der Umriß des Kristalls eingezeichnet. Rechts ist das Histogramm der Orientierungswinkel dargestellt. Das angepaßte Gaußmodell besitzt eine halbe Halbwertsbreite von $4,4^\circ$.

Die TDI- Moleküle sind hier sehr gut entlang der langen Kristallachse ausgerichtet. Die Form der Orientierungsverteilung kann jedoch aufgrund der Ungenauigkeit der Winkelbestimmung und der geringen Anzahl der Moleküle nicht genau bestimmt

werden. Sowohl Stufenverteilung nach Gleichung (94) als auch Gaußverteilung nach Gleichung (93) kommen in Frage.

Die ovalen Poren mit 1,0 nm Durchmesser verlaufen entlang dieser langen Kristallachse. Das Farbstoffmolekül TDI paßt mit einer Höhe von 0,91 nm nahezu perfekt in die Poren des UTD-1 Gerüsts. Da auch die Orientierungswinkel nahezu perfekt entlang der Pore ausgerichtet sind, kann davon ausgegangen werden, daß die Moleküle tatsächlich in der Pore und nicht in Rissen entlang der Porenrichtung eingelagert sind. In dem Modell in Abbildung 190 ist der Einbau von TDI in eine Pore von UTD-1 schematisch dargestellt.

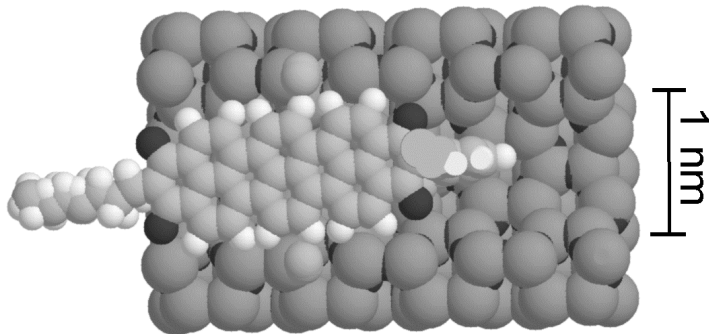


Abbildung 190: Kalottenmodell des Längsschnitts durch eine mit TDI gefüllte Pore von UTD-1.

4.7 Fluoreszenzspektren (Ensemble)

Neben der Richtung (Ort) und der Polarisation von Licht kann auch die Energie (Farbe) bestimmt werden. Da Laser mit frei durchstimmbarer Farbe zur Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren über einen großen Spektralbereich sehr aufwendig sind, werden nur die Fluoreszenzspektren aufgezeichnet. Dazu wird das eingesammelte Fluoreszenzlicht durch ein Gitter oder Prisma in seine Farben aufgetrennt und anschließend detektiert. Mit einem Gitter als energiedispersives Element kann zwar leicht eine sehr hohe Auflösung erreicht werden, jedoch treten bei der Beugung immer verschiedene Ordnungen auf, in denen Intensität verloren geht. Zusätzlich ist die Analyse bei sehr breiten Spektren durch die Überlagerung der verschiedenen Beugungsordnungen erschwert. Aus diesen Gründen wird hier ein Prismenspektrograph aufgebaut (siehe Kapitel 2.6.2.3). Dieser besitzt zwar nur ein Auflösungsvermögen von etwa 2 nm, jedoch kann fast das gesamte eingesammelte Fluoreszenzlicht detektiert werden. Wird ein Flächendetektor (CCD-Kamera) verwendet und der Spektrograph hinter dem Pinhole aufgebaut, so kann auf den Eintrittsspalt verzichtet werden und es ist nur eine zusätzliche Linse erforderlich, die das spektral zerlegte Fluoreszenzlicht auf der Kamera abbildet. Das beim Prisma auftretende Problem der nicht linearen Dispersion kann durch eine gründliche Wellenlängeneichung mit mehreren Farben gelöst werden (siehe Kapitel 2.6.2.3).

4.7.1 Silikalit 1 / UTD-1 mit Tetracen / Pentacen

In mehreren Proben wurde versucht, die unpolaren Farbstoffe Tetracen und Pentacen in die unpolaren, aus reinem SiO₂ bestehenden Porenstrukturen Silikalit-1 und UTD-1 über Gasphasendiffusion einzulagern (siehe Kapitel 3.3.3). Dabei werden leicht graue Kristalle erhalten, die schwach fluoreszieren. Die Fluoreszenzspektren der Kristalle unterscheiden sich jedoch erheblich von Spektren, die von Lösungen der Farbstoffe erhalten werden. Abbildung 191 zeigt die Fluoreszenzspektren der beladenen Kristalle.

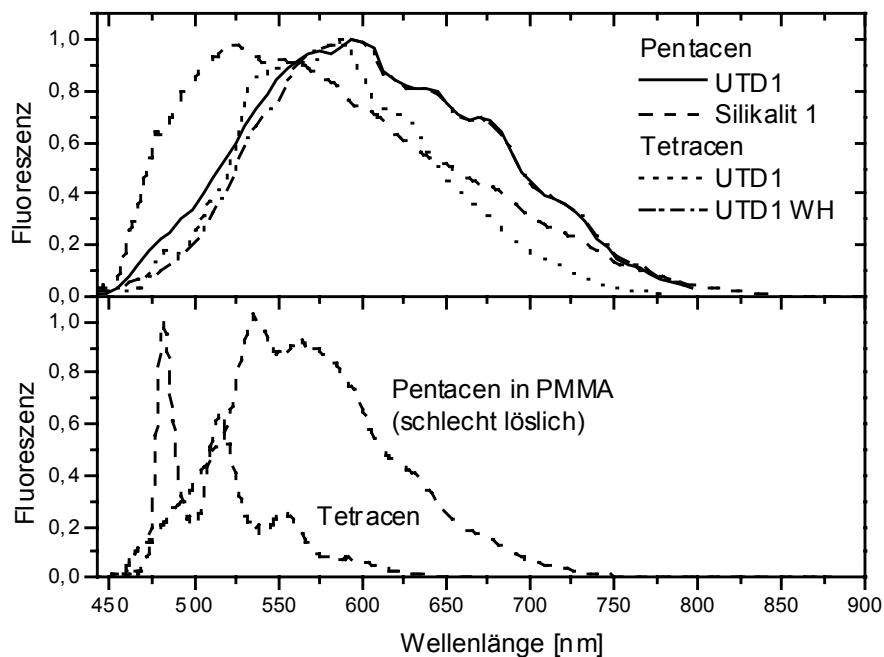


Abbildung 191: Fluoreszenzspektren von UTD-1 und Silikalit-1, die über die Gasphase mit Tetracen bzw. Pentacen beladen wurden. Unten ist zum Vergleich des Fluoreszenzspektrum von Tetracen und Pentacen in Chloroform bzw. PMMA angegeben. ($\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$).

Auffallend sind die sehr breiten Fluoreszenzspektren, die sich über den gesamten sichtbaren Bereich erstrecken. Dabei stellt sich die Frage, ob der Farbstoff noch intakt ist oder durch die hohe Temperatur beim Einlagern und katalytische Unterstützung des Zeolithen zu höher kondensierten Strukturen umgewandelt wurde. Einiges spricht jedoch für strukturell intakte Farbstoffmoleküle:

- Aus der mit Tetracen beladenen UTD-1 Probe kann Farbstoff ausgewaschen werden, der das erwartete Fluoreszenzspektrum von Tetracen zeigt. Der Farbstoff könnte aber auch von der Oberfläche stammen.
- Das detektierte Signal ist Fluoreszenz, da beim Bestrahlen Photobleichen beobachtet wird. Die Fluoreszenz muß jedoch von relativ kleinen Molekülen stammen, da Graphit und sehr große kondensierte Systeme wie Kohlenstoff-Nanoröhren keine Fluoreszenz zeigen.
- Auch an anderen Farbstoffen wurde schon beobachtet, daß durch die Einlagerung in Molekularsiebe sehr breite Fluoreszenzspektren erhalten werden [Binder1997].

4.7.2 Photoprodukt von Rhodamin 6G

Der gebräuchliche Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G zeigt ein langwelliges Photoprodukt, das nach intensiver Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda_{\text{Ex.}} = 442 \text{ nm}$) in geringen Mengen entsteht. Abbildung 192 zeigt das Fluoreszenzspektrum von Rhodamin 6G und des Photoprodukts.

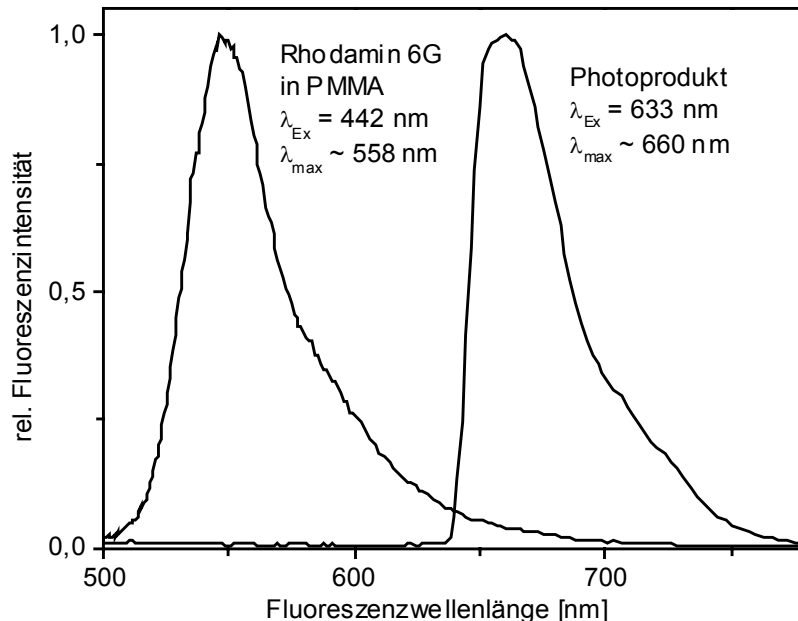


Abbildung 192: Nach intensiver Bestrahlung von Rhodamin 6G bildet sich ein langwelliges Photoprodukt. Das Fluoreszenzmaximum des Photoprodukts liegt bei etwa 660 nm.

Unter der Annahme eines realistischen Stokes-Shifts von $\sim 40 \text{ nm}$ liegt das geschätzte Absorptionsmaximum des Photoprodukts bei etwa 620 nm. Eine Anregung mit 633 nm ist zwar nicht optimal, aber dennoch möglich. Das Photoprodukt kann nicht nur in PMMA erzeugt werden, sondern wird auch in den M41S Fasern beobachtet. In diesen Fasern ist das Fluoreszenzmaximum des Photoprodukts leicht kurzwellig auf 650 nm verschoben.

Es sind sogar einzelne Moleküle des Photoprodukts detektierbar. In einer mit viel Farbstoff beladenen PMMA Probe (10^{-5} molar) sind mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm schwach leuchtende Einzelmoleküle erkennbar deren Fluoreszenzmaximum auch bei etwa 660 nm liegt. Es handelt sich hierbei nicht um die üblichen Verunreinigungen, da die Konzentration der einzelnen Photoproduktmoleküle klar vom Beladungsgrad des Rhodamin 6G Farbstoffes abhängt. Vermutlich wurden schon bei der Lagerung und der Verarbeitung des Farbstoffs einige Moleküle durch das Umgebungslicht in das Photoprodukt umgewandelt. Die langwellige Verschiebung des Photoprodukts kann nicht mit einem einfachen Modell erklärt werden, da bei den üblichen photochemischen Reaktionen der Chromophor verkleinert wird, was nur zu kurzwelligen Verschiebungen führt.

4.7.3 Photoprodukt von TDI

Nach intensiver Bestrahlung einer mit viel TDI beladenen PMMA Probe ($\sim 10^{-5}$ molar) entsteht ein kurzweilig fluoreszierendes Photoprodukt. Abbildung 193 zeigt die Fluoreszenzspektren von TDI jeweils vor und nach längerer Bestrahlung mit 633 nm.

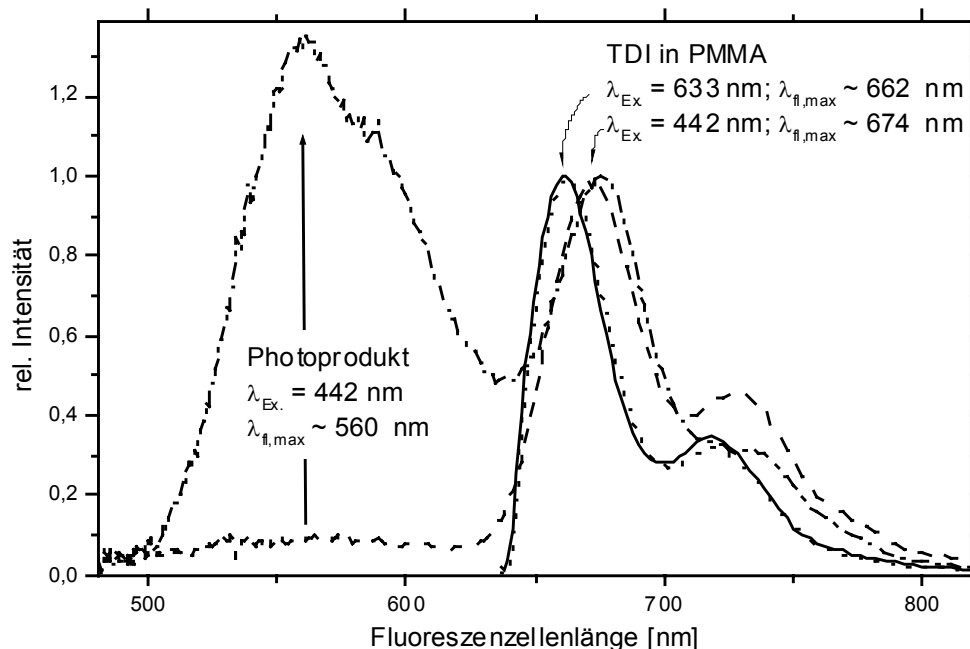


Abbildung 193: Fluoreszenzspektren von vielen TDI Molekülen in PMMA vor- und nach längerem Bestrahlen mit 633 nm. Es bildet sich ein Photoprodukt, das mit 442 nm angeregt werden kann und ein Fluoreszenzmaximum von etwa 560 nm besitzt.

Das Fluoreszenzmaximum des Photoprodukts liegt bei etwa 560 nm. Das kurzweilig verschobene Photoprodukt entsteht vermutlich durch eine photochemische Reaktion, die das konjugierte elektronische System des Chromophors teilweise zerstört. Von dem ähnlich aufgebauten Terrylen wird vermutet, daß es mit Sauerstoff über ein Endoperoxid das Diepoxyperrylen bildet, dessen Spektrum etwa 40 nm kurzweilig verschoben ist [Christ2001].

4.8 Fluoreszenzspektren von einzelnen Molekülen

Um ein Fluoreszenzspektrum eines einzelnen Moleküls zu bestimmen, sind mehr detektierte Photonen notwendig als für eine grobe Positionsbestimmung. Wird ein Signal zu Rauschen Verhältnis von 10 angestrebt, so sind aufgrund der Zählstatistik in jedem Kanal mindestens 100 detektierte Photonen notwendig. Bei einem 50 nm breiten Fluoreszenzspektrum werden bei einem Detektionsintervall von 2 nm 25 Kanäle beleuchtet. Insgesamt sind daher für ein Fluoreszenzspektrum mindestens 2000 detektierte Photonen nötig. Bei typischen Fluoreszenzraten von einzelnen Molekülen im konfokalen Mikroskop von 20 000 detektierten Photonen pro Sekunde, kann in weniger als einer Sekunde ein vernünftiges Fluoreszenzspektrum aufgezeichnet werden.

Die Fluoreszenzspektren der einzelnen Moleküle dienen zum einen dazu, die richtigen Moleküle zu identifizieren und zum anderen Artefakte durch Verunreinigungen zu eliminieren. Dabei ist jedoch zu beachten, daß identische Moleküle in geringfügig verschiedenen Umgebungen unterschiedliche Fluoreszenzspektren besitzen können. Diese Heterogenität in der Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand kann dadurch mit Einzelmolekülspektroskopie explizit untersucht werden. Daher kann die Frage beantwortet werden, welcher Anteil der Breite des Spektrums von vielen Molekülen durch die Heterogenität der Einbaulagen, und welcher durch die Linienbreite des einzelnen Moleküls hervorgerufen wird.

4.8.1 TDI in PMMA

Abbildung 194 zeigt Fluoreszenzspektren von verschiedenen einzelnen TDI Molekülen in PMMA.

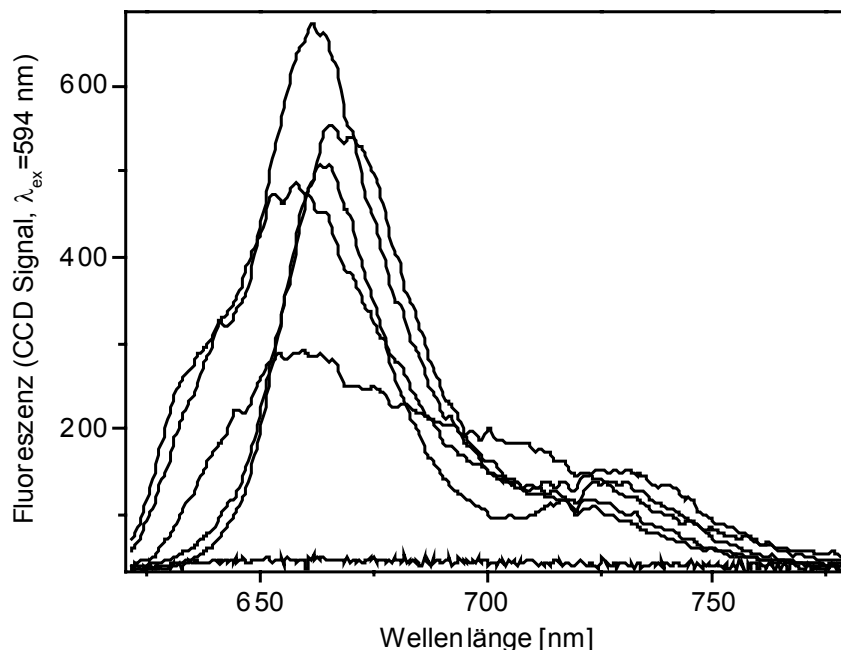


Abbildung 194: Verschiedene Fluoreszenzspektren einzelner TDI-Moleküle in PMMA.

In diesem Fall wurde mit 594 nm angeregt, mit einem Gitter dispergiert und mit einer stickstoffgekühlten CCD etwa 10 s integriert. Die Form der Fluoreszenzspektren reicht von breit und unstrukturiert bis hin zu gut aufgelösten Schwingungsstrukturen. Die Halbwertsbreite des 00-Übergangs (kurzwelligste Bande) ist bei den verschiedenen einzelnen Molekülen über einen Bereich von etwa 18 nm bis 35 nm verteilt; der Mittelwert beträgt etwa 28 nm (viele Moleküle). Die Lage der Fluoreszenzmaxima ist auf einen etwa 35 nm weiten Bereich zwischen 655 und 690 nm verteilt. Der Mittelwert, der bei der Beobachtung vieler Moleküle erhalten wird, liegt bei 662 nm. Der Abstand des 00-Übergangs zur Schwingungsbande bei etwa 725 nm beträgt nahezu immer $1355 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$.

4.8.2 Spektrale Dynamik von TDI in PMMA

Aufgrund der hohen Photostabilität von TDI in PMMA ist es möglich, eine große Anzahl von Fluoreszenzspektren eines einzelnen Moleküls aufzuzeichnen. Dadurch kann das dynamische Verhalten der Fluoreszenzspektren untersucht werden.

Es werden mehrere Serien aufgenommen, in denen einige zehntausend Spektren mit einer zeitlichen Abfolge von 25-35 ms enthalten sind. Trotz der kurzen Belichtungszeit eines einzelnen Spektrums ist die Qualität der Spektren sehr gut. Abbildung 195 zeigt ein Fluoreszenzspektrum eines einzelnen TDI Moleküls mit einer Belichtungszeit von nur 35 ms.

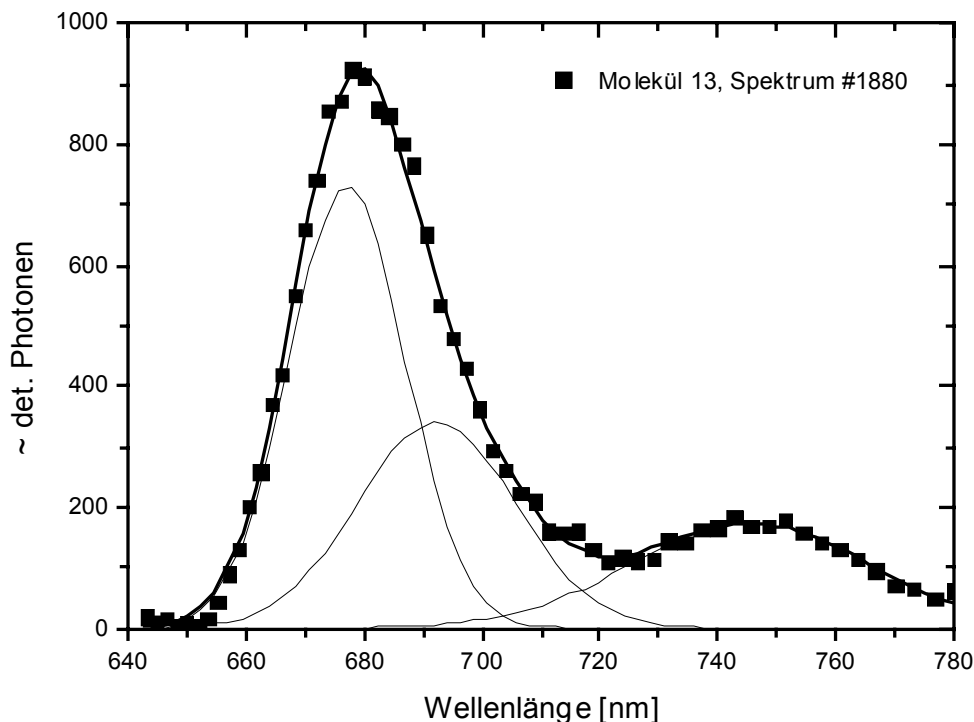


Abbildung 195: Fluoreszenzspektrum eines einzelnen TDI-Moleküls aus einer Serie von 34000 Spektren. Die Belichtungszeit beträgt nur 35 ms bei einer Anregungsleistung von 34 μW . Mit drei Gaußkurven kann das Spektrum zufriedenstellend beschrieben werden.

Um aus der Vielzahl der Spektren quantitative Schlüsse zu ziehen, ist es notwendig interpretierbare Größen wie Fluoreszenzmaximum, Breite des 00-Übergangs (kurzwelligsten Übergang), Abstand und Intensität der Schwingungsbande zu extrahieren. Zur Anpassung von Gaußkurven an die Fluoreszenzspektren müssen jedoch einige Punkte beachtet werden. Eine Anpassung von zwei Gaußkurven beschreibt das Spektrum sehr schlecht, bei der Wahl von drei Gaußkurven tritt jedoch das Problem auf, daß zwei Gaußkurven den 00-Übergang manchmal mit zwei, etwa gleich guten Möglichkeiten beschreiben. Dadurch würden in den Anpassungen Fluktuationen auftreten, die real nicht vorhanden sind. Es ist daher notwendig einige Parameter durch Voruntersuchungen zu bestimmen, und vorzugeben. Zufriedenstellende Anpassungen werden erhalten, wenn die 1. Schwingungsbande bei 320 cm^{-1} mit einer Amplitude von 50% der Amplitude des 00-

Übergangs liegt. Die Breiten beider Schwingungsbanden werden 1,6 mal so groß wie die Breite des 00-Übergangs gesetzt. Als freie Parameter bleiben dann die Position, Höhe und Breite des 00-Übergangs, sowie die Position und Höhe der langwelligen Schwingungsbande. In Abbildung 196 ist diese Anpassung mit 5 Parametern dargestellt.

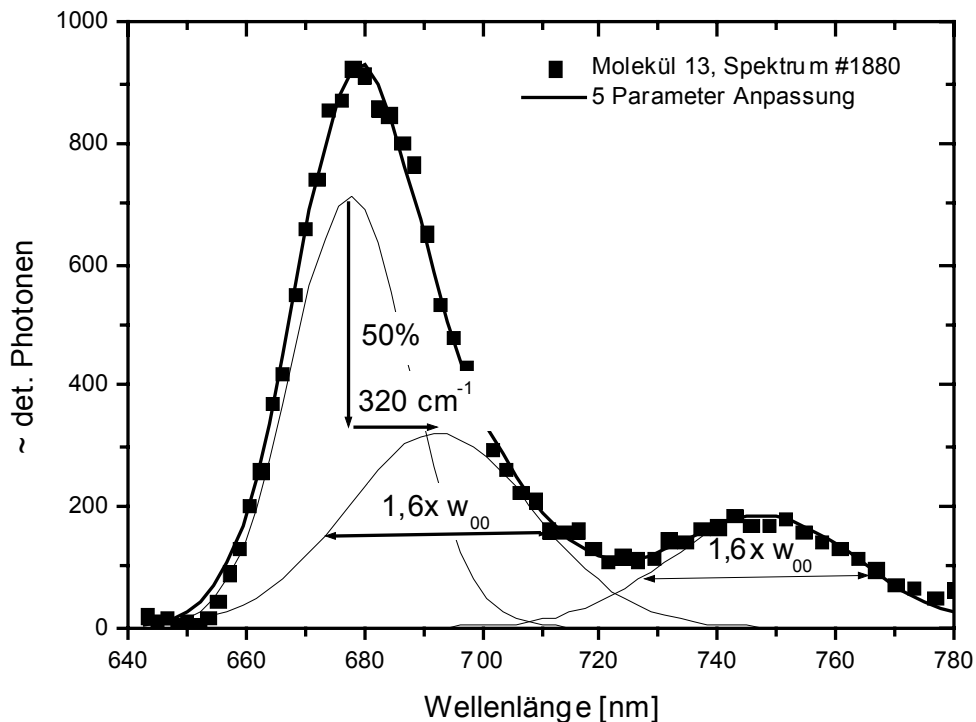


Abbildung 196: Anpassung des Fluoreszenzspektrums aus Abbildung 195 mit nur 5 freien Parametern. Die Pfeile stellen diejenigen Parameter dar, die nicht optimiert werden.

Zur Interpretation der Daten ist es wichtig, daß der Fehler der angepaßten Parameter ausgegeben wird. Diese werden aus den Diagonalelementen der Konvergenzmatrix C_{ii} und χ^2 berechnet und mit den Ergebnissen von Simulationen korrigiert (siehe Kapitel 2.6.2.3).

Das Maximum des 00- Übergangs in Abbildung 196 kann mit einer Genauigkeit von besser als 0,3 nm bestimmt werden, was gut mit theoretischen Abschätzungen von Gaußanpassungen übereinstimmt [Bobroff1986].

Eine Zeitspur der angepaßten Parameter ist in Abbildung 197 dargestellt. In diesem Molekül sind deutliche Veränderungen des Fluoreszenzspektrums beobachtbar.

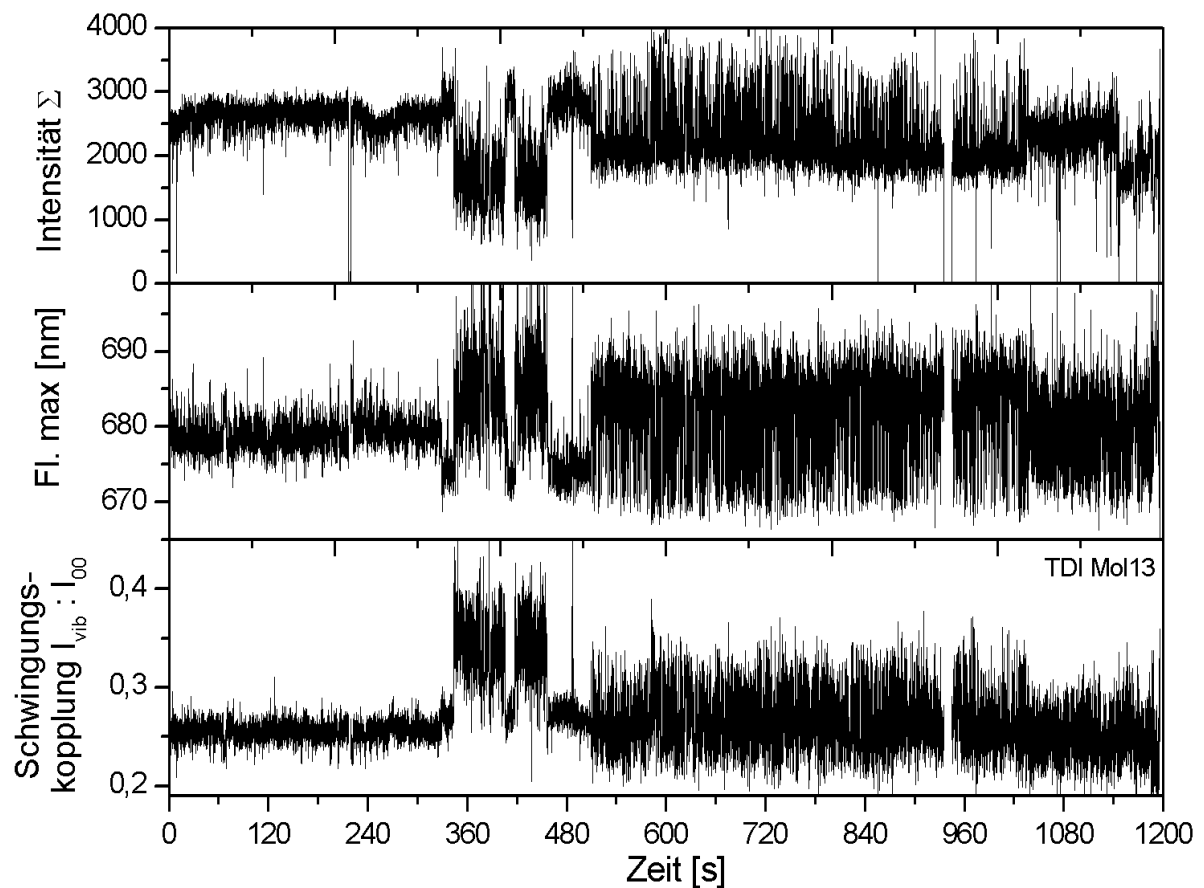


Abbildung 197: Verlauf von Intensität, Fluoreszenzmaximum und Schwingungskopplung eines einzelnen TDI-Moleküls. Von diesem Molekül konnten bis zu seinem irreversiblen Bleichen nach ~1200 s etwa 34000 Fluoreszenzspektren aufgezeichnet werden.

Die unterschiedliche Breite der Spuren ist nicht auf ein Rauschen zurückzuführen, sondern auf Fluktuationen zwischen mehreren Zuständen wie in dem kurzen Ausschnitt der Zeitspuren in Abbildung 198 ersichtlich ist.

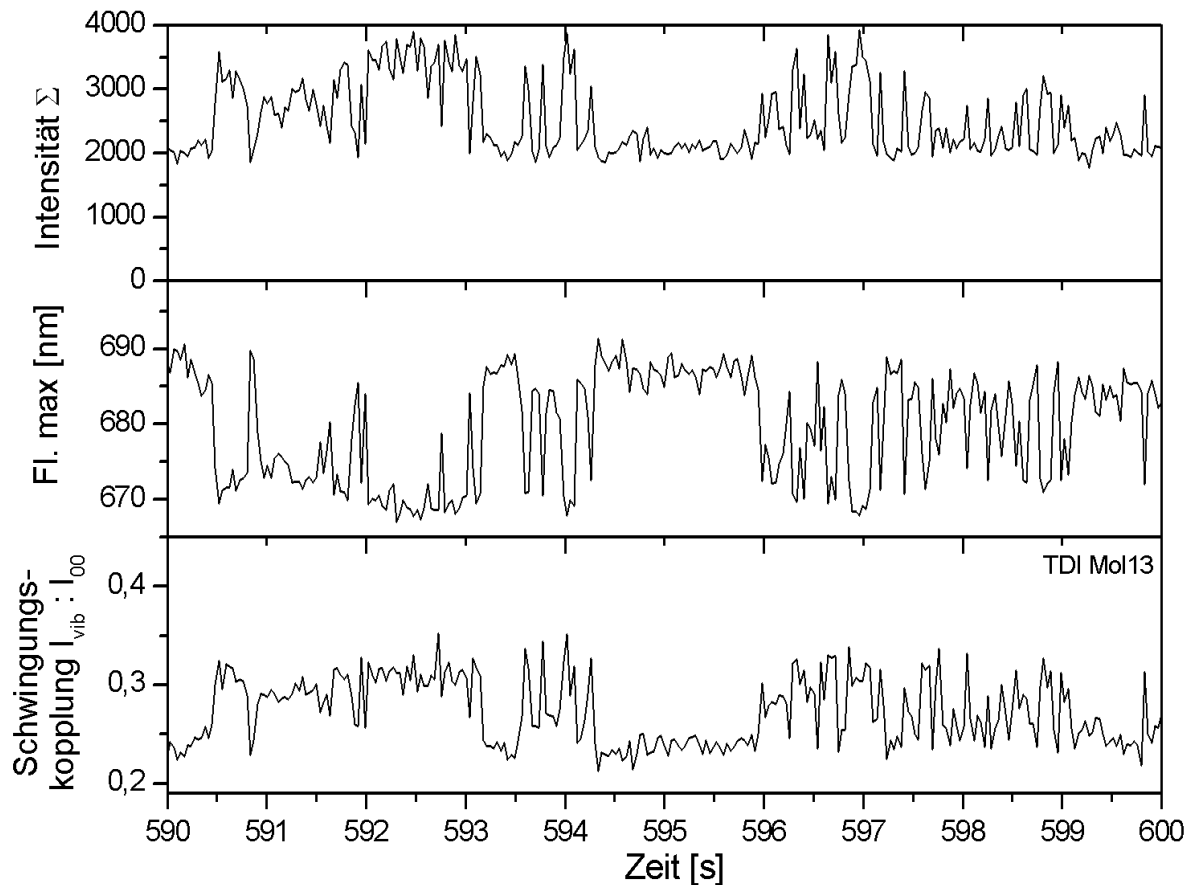


Abbildung 198: 10 Sekunden Ausschnitt der Zeitspur aus Abbildung 197.

Die Ursachen für diese Fluktuationen sind nicht bekannt. Die folgende Analyse der Franck-Condon-Zustände kann aber zumindest die physikalischen Prozesse dieser Fluktuationen beschreiben.

4.8.2.1 Franck-Condon-Zustände

Die Populationen der verschiedenen Fluoreszenzzustände werden zu einem Bild verarbeitet, das die relative Lage zwischen Grundzustand S_0 und angeregtem Zustand S_1 gemäß dem Franck-Condon-Prinzip beschreibt. Abbildung 199 zeigt die Lage von S_0 und S_1 in einem typischen Diagramm mit dem örtlicher Abstand der Potentialkurven nach rechts und dem energetischen Abstand nach oben.

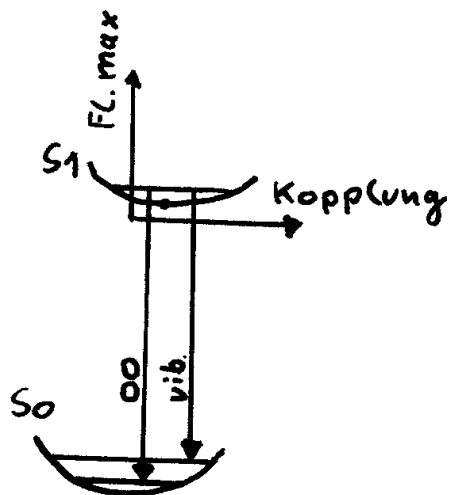


Abbildung 199: Franck-Condon Schema. Bei einer Verschiebung des S1 Zustandes nach rechts steigt die Schwingungskopplung, durch eine Verschiebung nach oben steigt die Energie des 00-Übergangs.

Der energetische Abstand bestimmt die Lage des Fluoreszenzmaximums, der örtliche Abstand bestimmt die Intensität der Fluoreszenz in Schwingungszustände.

Durch die Analyse von vielen Fluoreszenzspektren eines einzelnen Moleküls können Änderungen in der relativen Lage des S1-Zustandes dargestellt werden (Antragen des Fluoreszenzmaximums gegen die Schwingungskopplung). Dadurch sind verschiedene Franck-Condon Zustände darstellbar. Abbildung 200 zeigt dieses Vorgehen anhand von 194 Fluoreszenzspektren.

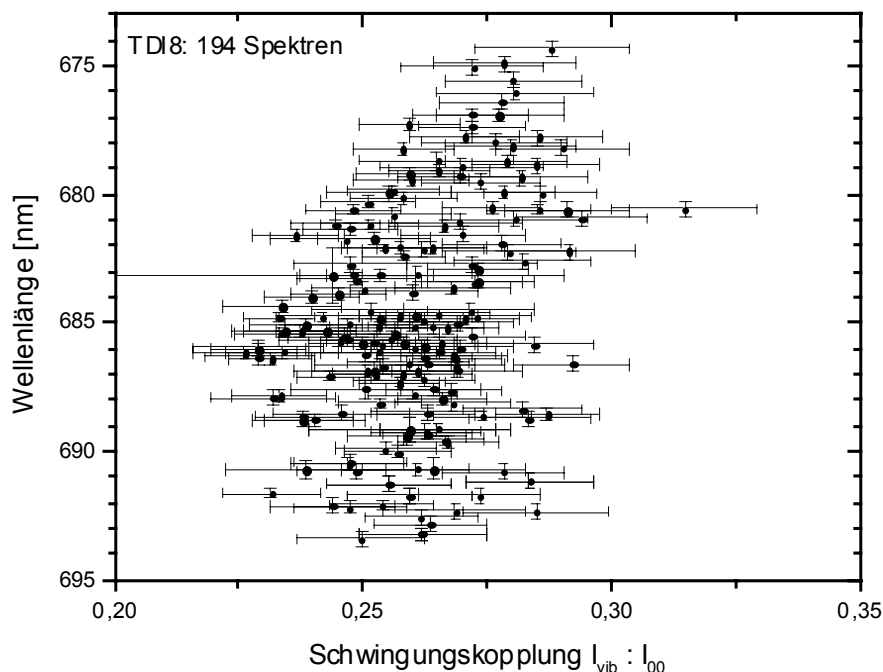


Abbildung 200: Schwingungskopplung und Maximum der 00-Fluoreszenz von 194 Spektren. Der Fehler in der Schwingungskopplung beträgt etwa 10%, das Fluoreszenzmaximum kann auf etwa 0,2 nm bestimmt werden.

In diesem Molekül variiert der energetische Abstand von S0 und S1 um fast 20 nm. Die Schwingungskopplung dagegen ändert sich, im Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit von etwa 10%, hier nur geringfügig.

Können mehr als etwa 1000 Fluoreszenzspektren bis zum Photobleichen gemessen werden, so ist die Bildung eines zweidimensionalen Histogramms vorteilhaft. Die Kanalbreite für die Bildung der Histogramme wird der Bestimmungsgenauigkeit der einzelnen Fluoreszenzspektren angepaßt. Abbildung 201 zeigt die Franck-Condon Zustände von etwa 1200 Fluoreszenzspektren eines TDI Moleküls. Dieses Molekül besitzt zwei deutlich getrennte Zustände.

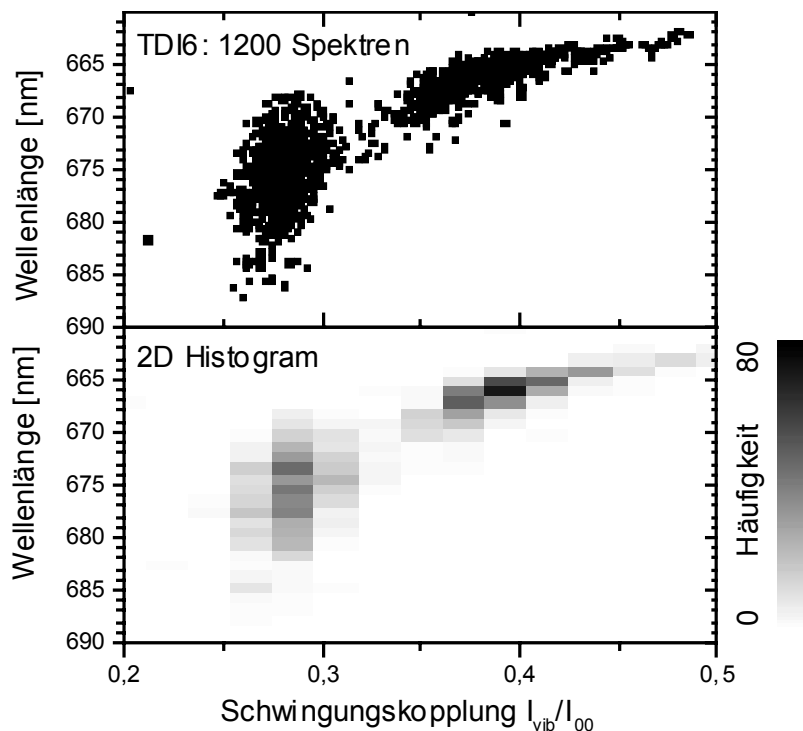


Abbildung 201: Zwei verschiedene Franck-Condon-Zustände. Die Darstellung oben zeigt in zwei Wolken die Lage von 1200 Fluoreszenzspektren. Das zweidimensionale Histogramm unten gibt die Häufigkeit der gemessenen Zustände an.

Mit dieser neu entwickelten Methode der Histogrammbildung von Franck-Condon-Zuständen werden die Fluoreszenzspuren von mehreren TDI-Molekülen analysiert.

Die Abbildungen 202 und 203 zeigen die 8 besten zweidimensionalen Histogramme von insgesamt 21 untersuchten Molekülen.

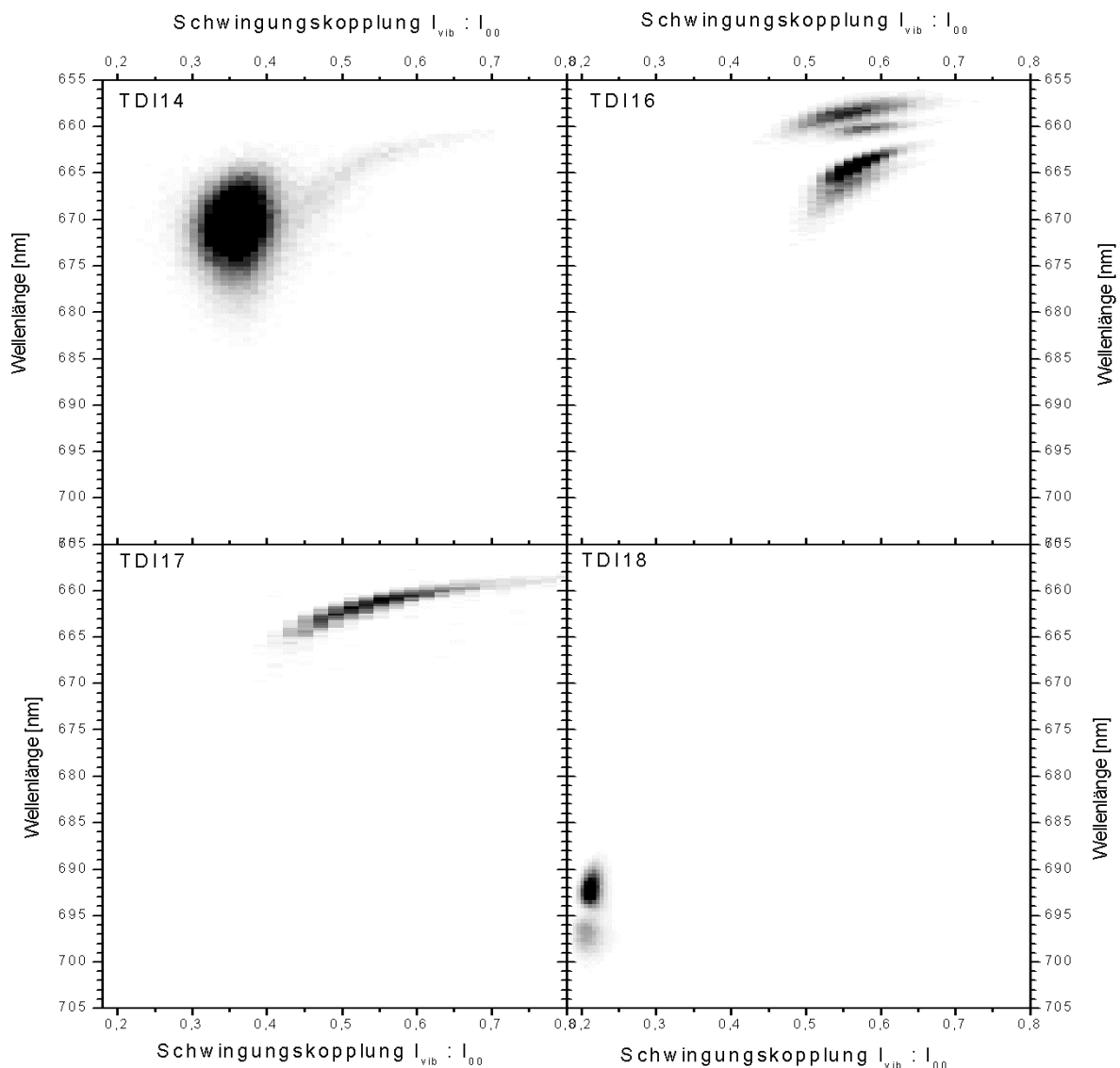


Abbildung 202: Franck-Condon-Zustände von verschiedenen TDI Molekülen. Alle Moleküle werden im gleichen Maßstab dargestellt.

Links oben #14 aus 70000 Spektren: 3 bis 4 Zuständen zwischen 666 nm und 675 nm und einer Kopplung von 0,36 (leider stark überlagert, und daher schwer zu sehen), kurz vor dem Bleichen zwei Zustände mit 666 nm - 0,50 und 662 nm - 0,57.

Rechts oben #16 aus 32000 Spektren: 4 Zustände mit definierten Wellenlängen (658/660/664,5/667 nm), aber breiter Verteilung der Kopplung.

Links unten #17 aus 2800 Spektren: Ein sehr breit verteilter Zustand um 661 nm - 0,54.

Rechts unten #18 aus 100000 Spektren: Am Anfang 693 nm, am Ende bis zum Bleichen 697 nm.

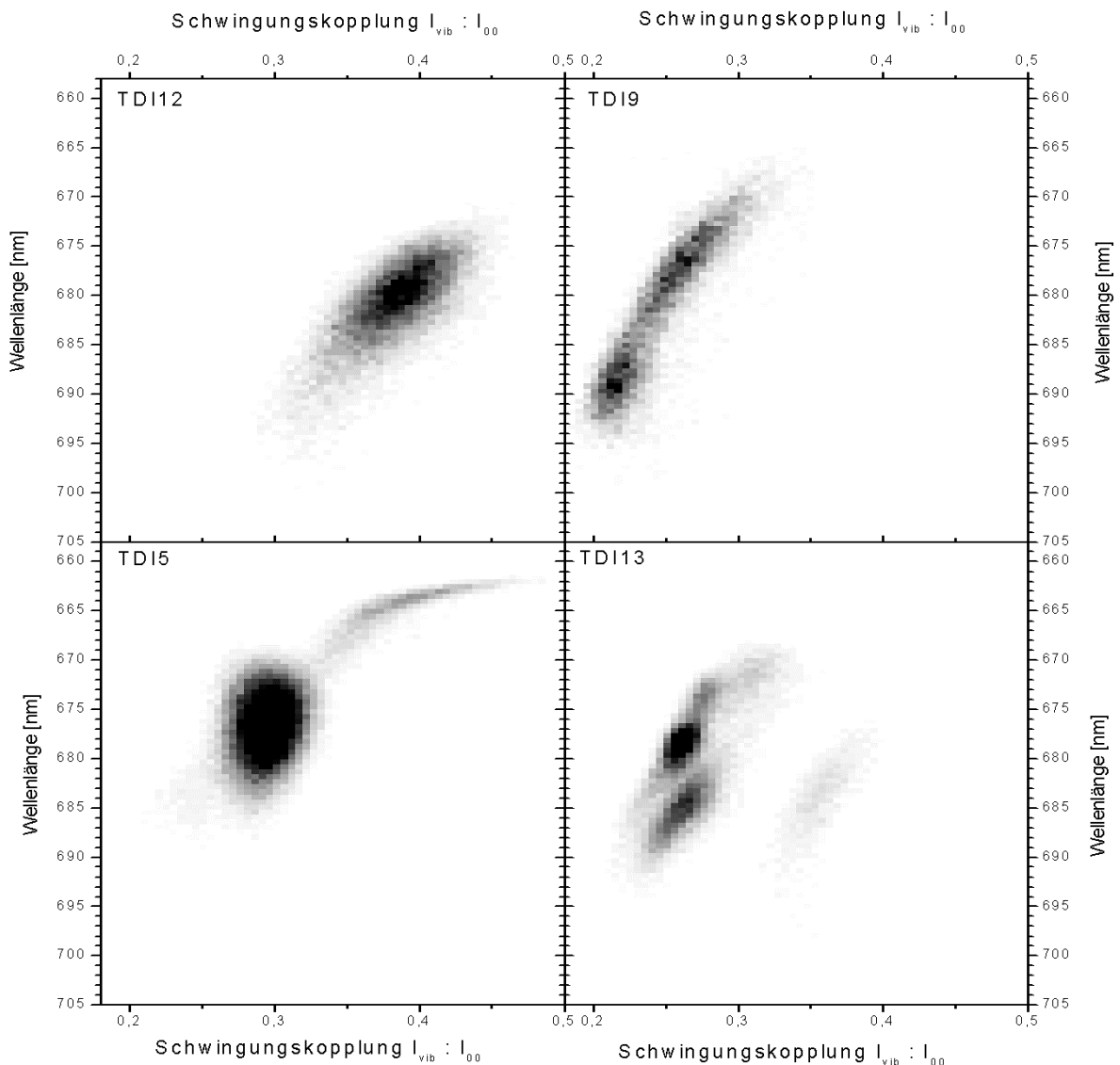


Abbildung 203: Franck-Condon-Zustände von verschiedenen TDI Molekülen. Alle Moleküle werden im gleichen Maßstab dargestellt.

Links oben #12 aus 23000 Spektren: Hauptzustand bei 680 nm mit selteneren Ausreißern nach 691 nm.

Rechts oben #9 aus 8500 Spektren: Zwei etwa gleich wahrscheinliche Zustände, die im Zeitraum von Sekunden wechseln.

Links unten #5 aus 58000 Spektren: Breiter Hauptzustand bei 677 nm - 0,3 und 3 weitere Zustände, die am Ende der Zeitspur besetzt werden 683,5/667/664 nm.

Rechts unten #13 aus 34000 Spektren: Mindestens 5 Zustände (siehe Zeitspuren in den Abbildungen 197 und 198).

Einige Zustände überlagern sich sehr stark, so daß die Unterscheidung nur sehr schwer sichtbar ist. Das Fluoreszenzspektrum von vielen TDI-Molekülen in PMMA besitzt mit dem hier verwendeten Modell aus drei Gaußfunktionen eine Übergangswellenlänge von 660 nm und eine Schwingungskopplung von 0,44. Im Vergleich zu diesem mittleren Fluoreszenzspektrum sind die Spektren der einzelnen Moleküle meist um einiges langwelliger. Dies kann an der bevorzugten Selektion der langwelligeren Fluoreszenzspektren liegen, da bei den kurzwelligen

Fluoreszenzspektren die Gefahr besteht, daß diese durch die Fluoreszenzfilter abgeschnitten werden.

Auffallend ist, daß die Schwingungskopplung bei größeren Wellenlängen abnimmt. Dies ist bei verschiedenen Molekülen (z.B. #18) und auch bei verschiedenen Franck-Condon-Zuständen eines Moleküls (z.B. #9) beobachtbar. Zwei Moleküle (#5, #14) zeigen kurz vor dem Photobleichen eine kurzweilige Verschiebung um etwa 10 nm, die mit einer verstärkten Schwingungskopplung verbunden ist.

4.8.3 MCM-41 mit Cy5

Trotz einer nur geringen Photostabilität von Cy5 in MCM-41 können Fluoreszenzspektren einzelner Farbstoffmoleküle aufgezeichnet werden. Abbildung 204 zeigt 5 verschiedene Fluoreszenzspektren einzelner, kovalent an die Porenwand von MCM-41 angebundener, Cy5 Moleküle.

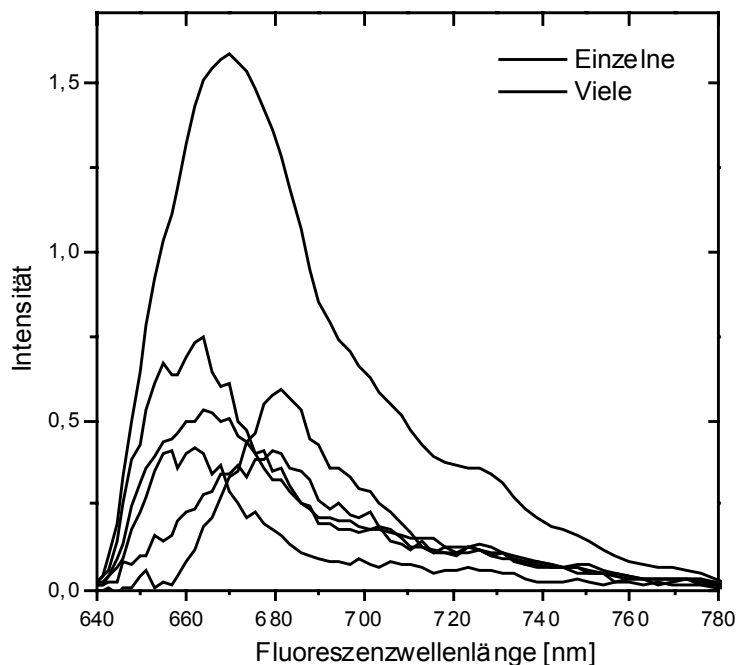


Abbildung 204: Fluoreszenzspektren einzelner Cy5 Moleküle in MCM41. Die dicke Linie ist das Fluoreszenzspektrum einer Probe mit vielen Molekülen.

Die Maxima der Fluoreszenzspektren der einzelnen Moleküle sind über einen Bereich von 660 bis 680 nm verteilt. Das Fluoreszenzspektrum vieler Moleküle liegt mit 670 nm genau in der Mitte. Ähnlich dem Fluoreszenzspektrum in Ethanol (siehe Kapitel 3.1.10.5) ist die Schwingungsbande bei etwa 720 nm nur als Schulter vorhanden. Obwohl Lage und Form von Fluoreszenzspektren kein strikter Beweis für das Vorliegen von Cy5 Molekülen sind, kann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit eine Verunreinigung mit anderen Farbstoffen ausgeschlossen werden.

Von einem Molekül war es möglich bis zum irreversiblen Photobleichen 10 Fluoreszenzspektren im Abstand von einer Sekunde aufzunehmen. In Abbildung 205 ist sichtbar, daß sich die Lage des Fluoreszenzmaximums mit der Zeit ändert. Die

Spektrale Diffusion von etwa 2 nm ist größer als die Genauigkeit der Bestimmung des Maximums von etwa $\pm 0,5$ nm.

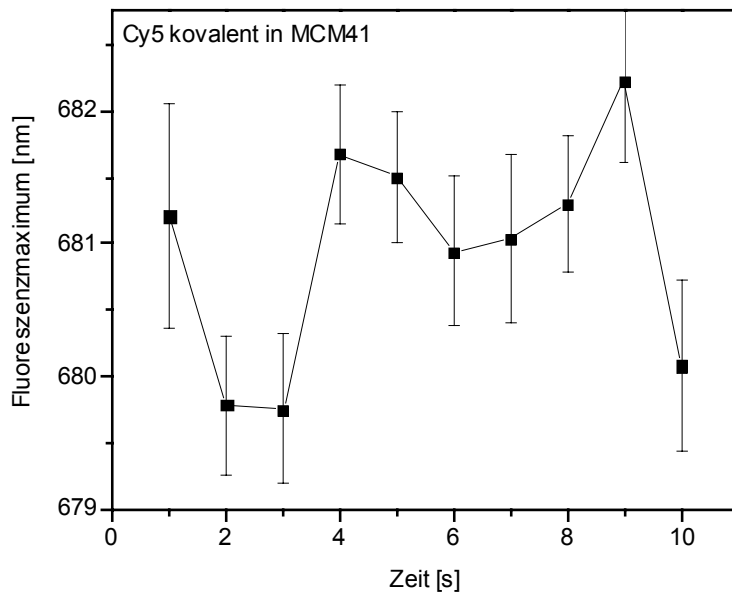


Abbildung 205: Zeitliche Änderung des Fluoreszenzmaximums von Cy5 in MCM41. ($\lambda_{\text{ex}} = 633$ nm, $I_{\text{spot}} = 11\mu\text{W}$).

4.8.4 $\text{AlPO}_4\text{-5}$ mit Oxazin Farbstoffen

Oxazin Farbstoffe die während der Synthese in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ eingelagert werden, zeigen zwar ein etwas schwächeres Fluoreszenzsignal als Cy5 in MCM-41. Jedoch ist die Photostabilität besser. Bei dem Farbstoff Oxazin 170 ist die kurzweilige Fluoreszenz bei etwa 655 nm problematisch da bei einer Anregung mit 633 nm die Fluoreszenzfilter bis etwa 645 nm sperren. Ein Fluoreszenzmaximum unter 650 nm kann daher mit dieser Anregungswellenlänge nur ungenau bestimmt werden. Beispiele von Fluoreszenzspektren einzelner Oxazin Farbstoffe in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ sind in den Abbildungen 206, 207 und 208 aufgeführt.

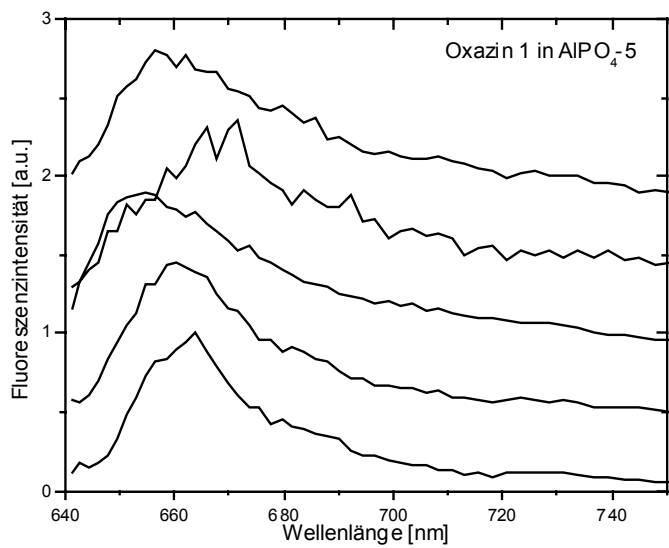


Abbildung 206: Fluoreszenzspektren 5 einzelner Oxazin 1 Moleküle in $\text{AlPO}_4\text{-5}$.

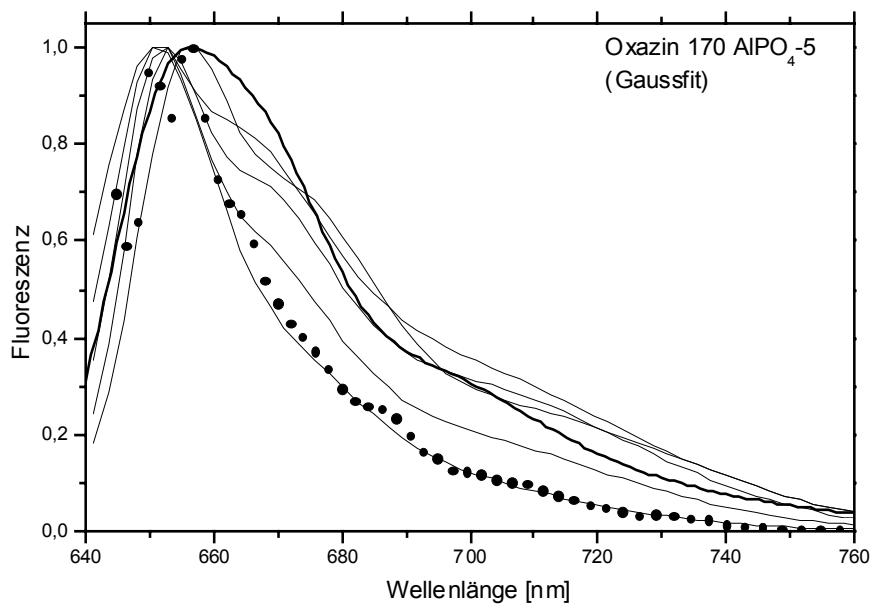


Abbildung 207: Fluoreszenzspektren einzelner Oxazin 170 Moleküle. Da die Spektren relativ nahe beieinander liegen, wurden die Meßwerte (Für eine Kurve sind diese als Punkte dargestellt) durch Gaußkurven geglättet. Das Fluoreszenzspektrum von vielen Molekülen ist dick eingezeichnet.

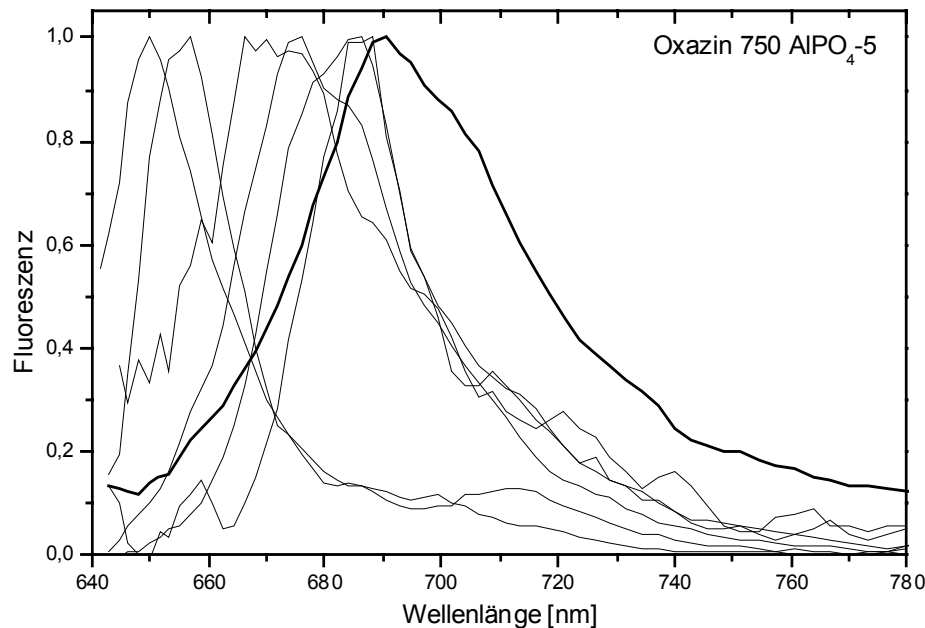


Abbildung 208: Fluoreszenzspektren einzelner Oxazin 750 Moleküle in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Das Fluoreszenzspektrum von vielen Molekülen ist dick eingezeichnet.

Die Maxima der Fluoreszenzspektren sind bei Oxazin 1 und Oxazin 170 über einen relativ kleinen Bereich verteilt 654-670 nm (662 ± 8) bei Oxazin 1; 650-658 nm (654 ± 4) bei Oxazin 170. Die Fluoreszenzspektren von einzelnen Oxazin 750 Molekülen dagegen sind über einen weiten Bereich (667 ± 18) von 650 bis 685 nm verteilt. Einige Spektren der einzelnen Oxazin 750 Moleküle sind stark zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Die schlechte Übereinstimmung mit dem mittleren Spektrum von vielen Molekülen wird dadurch erklärt, daß besonders die lichtstarken und langlebigen Moleküle für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren ausgewählt wurden. Unter der Annahme, daß der Stokes shift der Moleküle annähernd konstant bleibt, können einzelne Oxazin 750 Moleküle, die bei etwa 700 nm fluoreszieren, mit dem Laser mit $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$ nur relativ schwach angeregt werden.

An den Fluoreszenzspektren von Oxazin 750 ist gut die Verbreiterung des Spektrums bei vielen Molekülen beobachtbar. Die Breite bei halber Höhe des Fluoreszenzspektrums vieler Moleküle beträgt etwa 45 nm, während die Breite der Spektren einzelner Moleküle oft nur etwa 20 nm beträgt. Da die Form der Fluoreszenzspektren einzelner Oxazin 750 Moleküle aber immer noch gaußförmig (und nicht lorenzförmig wie sie aufgrund der Unschärfe der Fluoreszenzniveaus werden könnten) sind, ist die Breite von spektraler Diffusion bestimmt. Nur spektrale Diffusion, die langsamer als die Detektionsrate der Fluoreszenzspektren ist (d.h. etwa im Sekundenbereich) kann hier detektiert werden.

Große Änderungen im Fluoreszenzspektrum können an dem Oxazin 1 Molekül in Abbildung 209 direkt beobachtet werden.

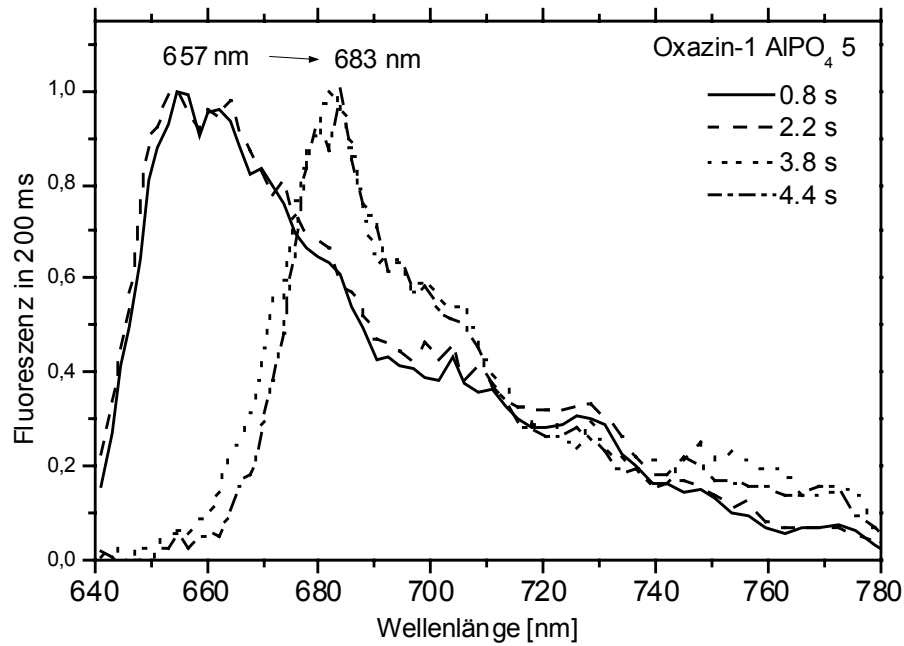


Abbildung 209: Starke Änderung des Fluoreszenzspektrums eines einzelnen Oxazin 1 Moleküls nach etwa 3 Sekunden.

Bei einer solch großen Änderung der Übergangsenergie wird vermutlich der Chromophor chemisch verändert. Bei einem anderen Oxazin 1 Molekül konnte neben dem Fluoreszenzsprung auch die Orientierung aufgezeichnet werden (siehe Kapitel 4.9.2.2). Bei geringeren spektralen Änderungen muß die Position des Maximums und dessen Fehler analysiert werden. Zwei Beispiele sind in den Abbildungen 210 und 211 dargestellt.

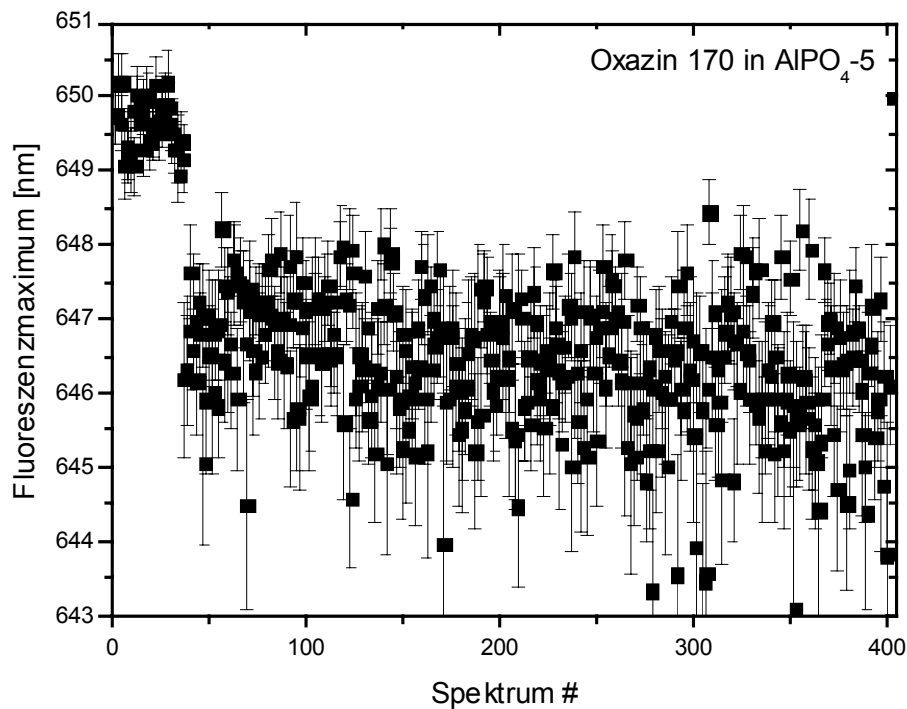


Abbildung 210: Zeitliche Veränderungen des Fluoreszenzmaximums von Oxazin 170 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Die Spektren wurden in Abstand von 1 s aufgenommen.

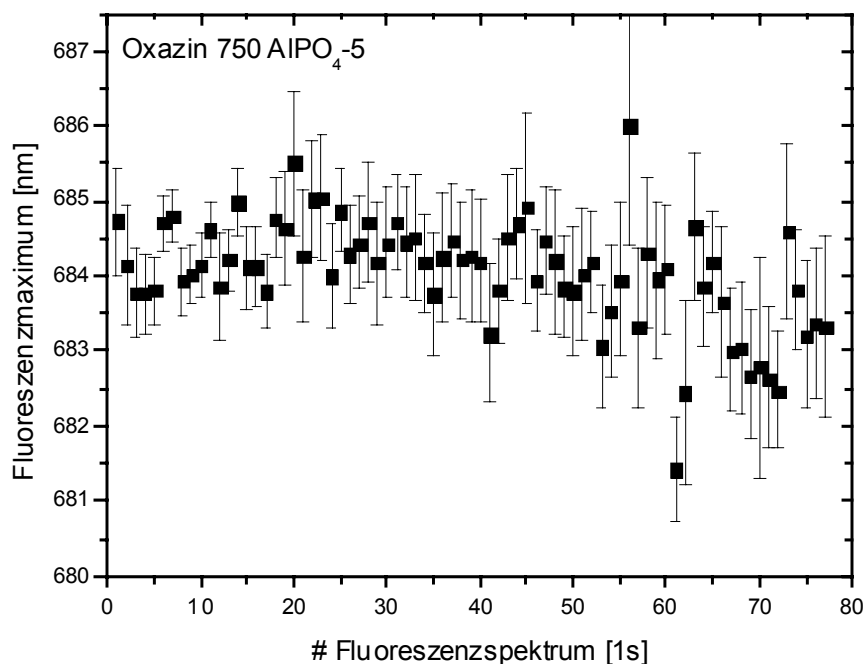


Abbildung 211: Zeitliche Veränderungen des Fluoreszenzmaximums von Oxazin 750 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$.

Im ersten Beispiel wird im Fluoreszenzspektrum von Oxazin 170 nach 36 Sekunden deutlich ein plötzlicher Sprung von etwa 3 nm beobachtet (An genau diesem Molekül werden in Kapitel 4.4.3.1 auch Tripletraten bestimmt). Im zweiten Beispiel liegen die Schwankungen des Fluoreszenzmaximums Anfangs in Rahmen der Meßgenauigkeit,

doch gegen Ende der Lebensdauer des Oxazin 750 Moleküls treten Schwankungen auf, die sicher über dem Bestimmungsfehler liegen.

Die Analyse der Franck-Condon Abstände für sechs verschiedene Oxazin 750 Moleküle ist in Abbildung 212 dargestellt.

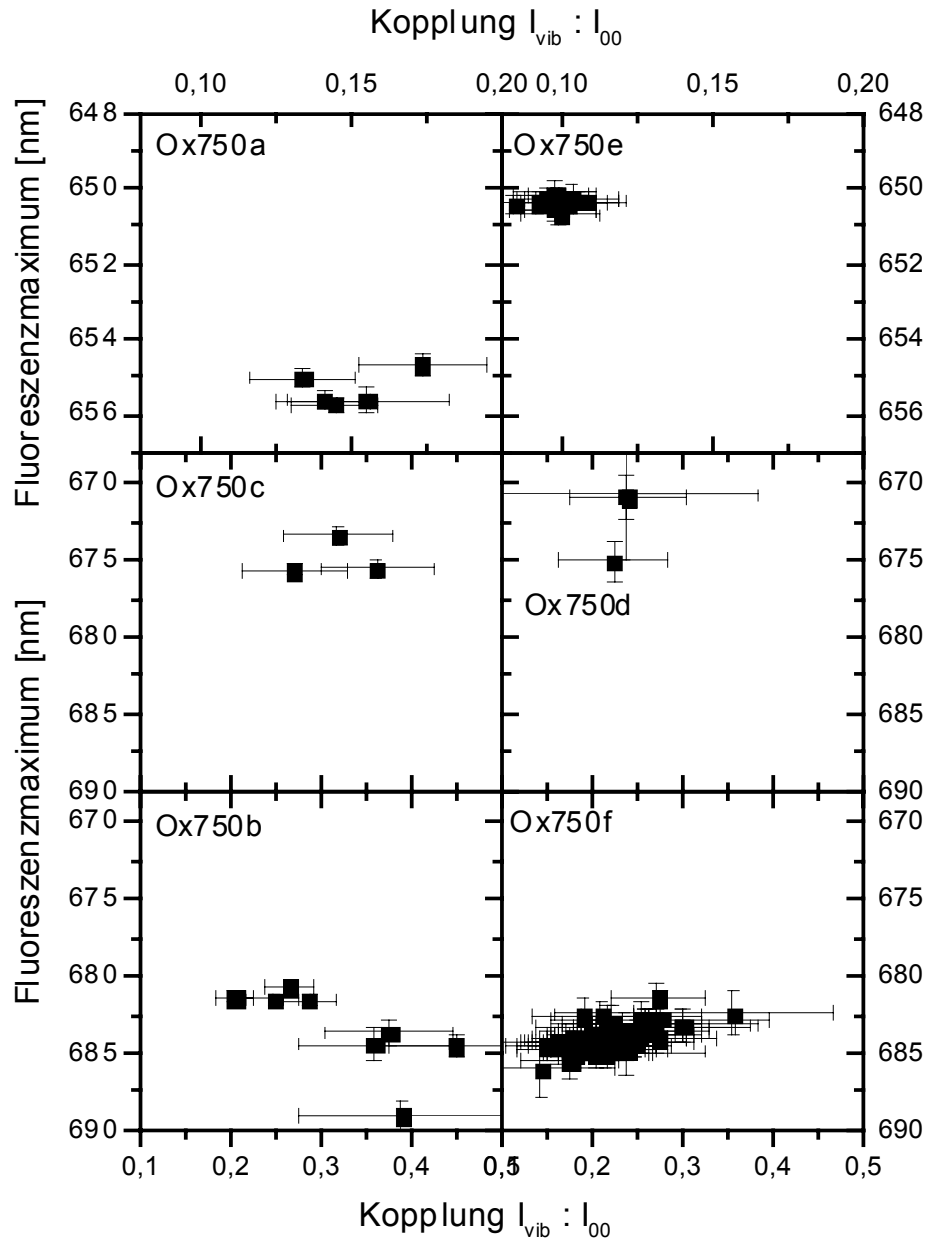


Abbildung 212: Franck-Condon-Zustände von sechs einzelnen Oxazin 750 Molekülen in $\text{AlPO}_4\text{-5}$.

Zur besseren Darstellung sind die beiden oberen Diagramme in einem anderen Maßstab gezeichnet. Aus den Diagrammen ist ersichtlich, daß zwischen den Molekülen sehr große Unterschiede auftreten. Die Lage des Fluoreszenzmaximums reicht von 650 nm bis 685 nm, die Schwingungskopplung ist relativ klein und überstreicht einen Bereich von etwa einer halben Größenordnung (0,1 bis 0,45). Während geringe Änderungen des Fluoreszenzmaximums in fast allen Fällen sicher bestimmbar sind, ist eine Änderung der Schwingungskopplung aufgrund ihres

großen Fehlers nur selten nachweisbar (z.B. bei Molekül Ox750b links unten). Zwei diskrete Franck-Condon-Zustände sind gut an dem einen langlebigen Oxazin 170 Molekül aus Abbildung 210 nachweisbar. Die entsprechende Franck-Condon-Fläche ist in Abbildung 213 dargestellt.

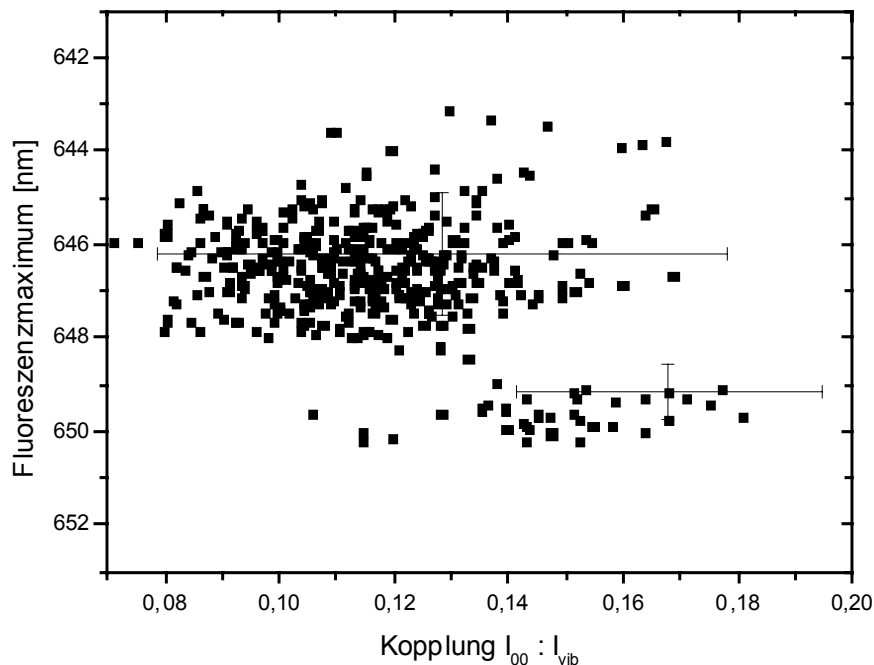


Abbildung 213: Franck-Condon-Zustände eines einzelnen Oxazin 170 Moleküls in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. An den beiden Spektren unmittelbar vor und nach der Änderung sind exemplarisch die Bestimmungsfehler eingezeichnet.

Insgesamt entsteht der Eindruck, daß zwar bei dem größeren Farbstoffmolekülen (Oxazin 750) die Parameter der Fluoreszenzspektren wie Fluoreszenzmaximum und Schwingungskopplung über einen größeren Bereich verteilt sind, große Änderungen jedoch eher bei den kleineren Farbstoffmolekülen (Oxazin 1) auftreten. Dies paßt zu dem Bild, daß die großen Farbstoffmoleküle, die sicher nicht in die Poren von $\text{AlPO}_4\text{-5}$ passen, gepreßt und unbeweglich in Mesoporen sitzen, während die kleineren Moleküle vom Festkörper weniger beeinflusst werden und beweglicher sind.

4.8.5 Monolith mit TDI

Durch die Synthese mit einem Flüssigkristall sind sehr große, glasartig Stücke eines mesoporösem Festkörpers (M41S Monolith) hergestellt worden. In diesem sind neben diffundierenden TDI Molekülen auch einige immobile beobachtet worden (siehe Kapitel 4.4.7). An solchen, nicht frei diffundierenden Molekülen, wurden schon in Kapitel 4.6.7 Orientierungsuntersuchungen durchgeführt.

Eine Auswahl von 5 Fluoreszenzspektren ist in Abbildung 214 dargestellt.

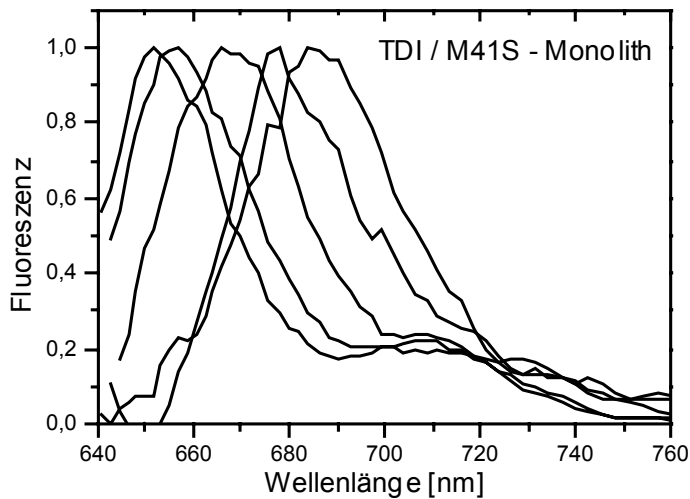


Abbildung 214: 5 verschiedene Fluoreszenzspektren von TDI im M41S Monolith. Die Maxima der Spektren sind über einen weiten Bereich von 650 nm bis 685 nm verteilt.

Ähnlich wie in der PMMA Umgebung (siehe Abbildung 194) sind die Maxima der Spektren über einen weiten Bereich verteilt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von TDI im Templat der Poren ist es in dieser Umgebung nicht möglich, ein Fluoreszenzspektrum von vielen Molekülen aufzuzeichnen. Jedoch ist das Maximum der Summe aller untersuchten Moleküle bei 659 ± 2 nm zu finden. Die abgebildeten stark langwellig verschobenen Fluoreszenzspektren stellen also eher die Ausnahme dar. Durch Anpassen der aufgezeichneten Fluoreszenzspektren mit passenden Gaußkurven (gleiches Modell mit 3 Gaußkurven und 5 Parametern wie bei der Untersuchung von TDI in PMMA) kann das Fluoreszenzmaximum je nach Signalstärke auf etwa 1 bis 2 nm bestimmt werden. Abbildung 215 zeigt an den Zeitspuren von 3 TDI Molekülen, daß in den Proben eine Spektrale Diffusion von etwa 2 bis 5 nm vorhanden ist, die knapp über der Bestimmungsgenauigkeit liegt.

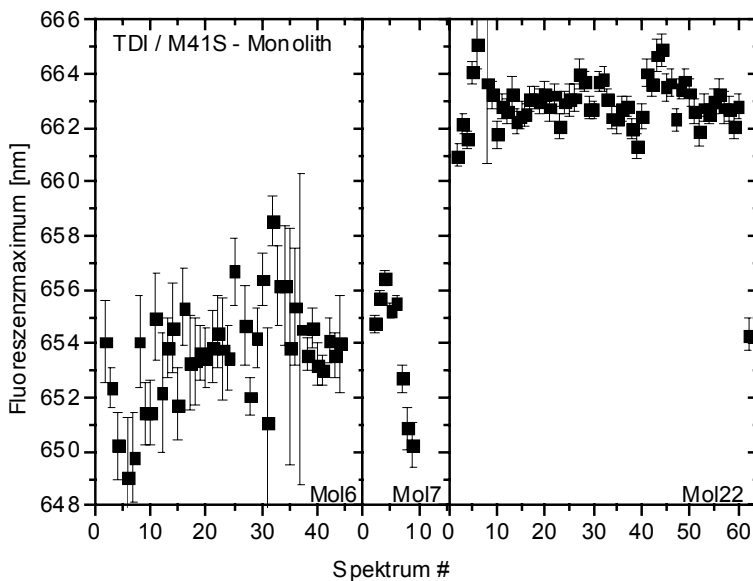


Abbildung 215: Spektrale Diffusion von drei TDI Molekülen im M41S Monolith.

4.8.6 UTD-1 mit TDI

Der Farbstoff TDI konnte aus der Lösung in kalzinierte UTD-1 Kristalle eingebracht werden. In Kapitel 4.6.8 konnte schon gezeigt werden, daß die einzelnen TDI Moleküle sehr gut entlang der langen Kristallachse und damit der Porenrichtung ausgerichtet sind. Die Fluoreszenzspektren von 5 einzelnen Molekülen sind in Abbildung 216 dargestellt.

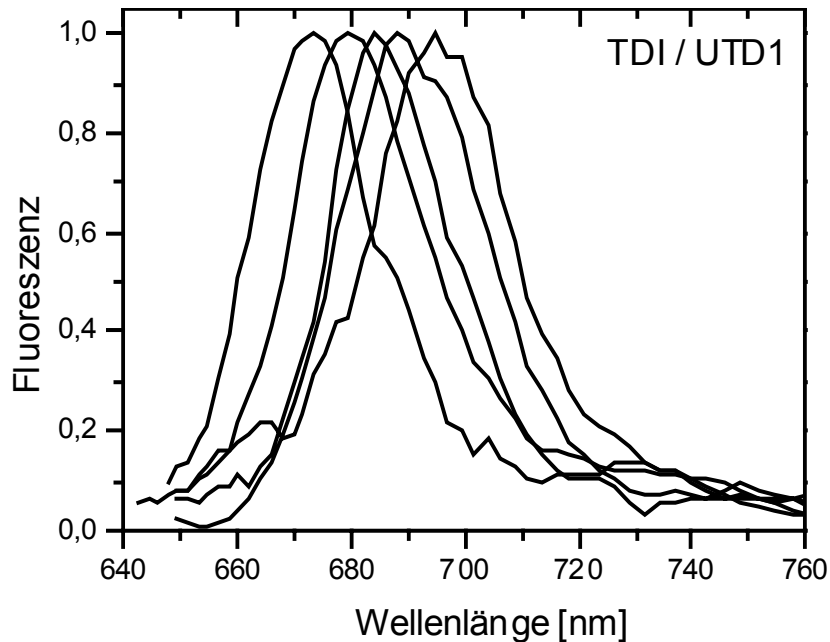


Abbildung 216: Fluoreszenzspektren von einzelnen TDI Molekülen in UTD1.

Die Maxima der Spektren sind über einen Bereich von 25 nm um 684 nm verteilt. Im Vergleich zum mittleren Fluoreszenzspektrum in PMMA ($\lambda_{\max} = 660$ nm) sind diese Fluoreszenzspektren stark langwellig verschoben. Dies ist aber nicht besonders ungewöhnlich, da auch in PMMA die einzelnen Fluoreszenzspektren bis 700 nm verschoben sind. Auffallend ist die nur schwach ausgeprägte Schwingungsbande bei etwa 750 nm, die nur eine Schwingungskopplung von $\sim 0,1$ erreicht (I_{vib} / I_{00} im zuvor beschriebenen Modell mit 3 Gaußfunktionen und 5 Parameter).

Auch zeitliche Änderungen des Fluoreszenzspektrums werden beobachtet. Abbildung 217 zeigt wie sich nach etwa 100 Spektren das Fluoreszenzmaximum deutlich um 5 nm verschiebt.

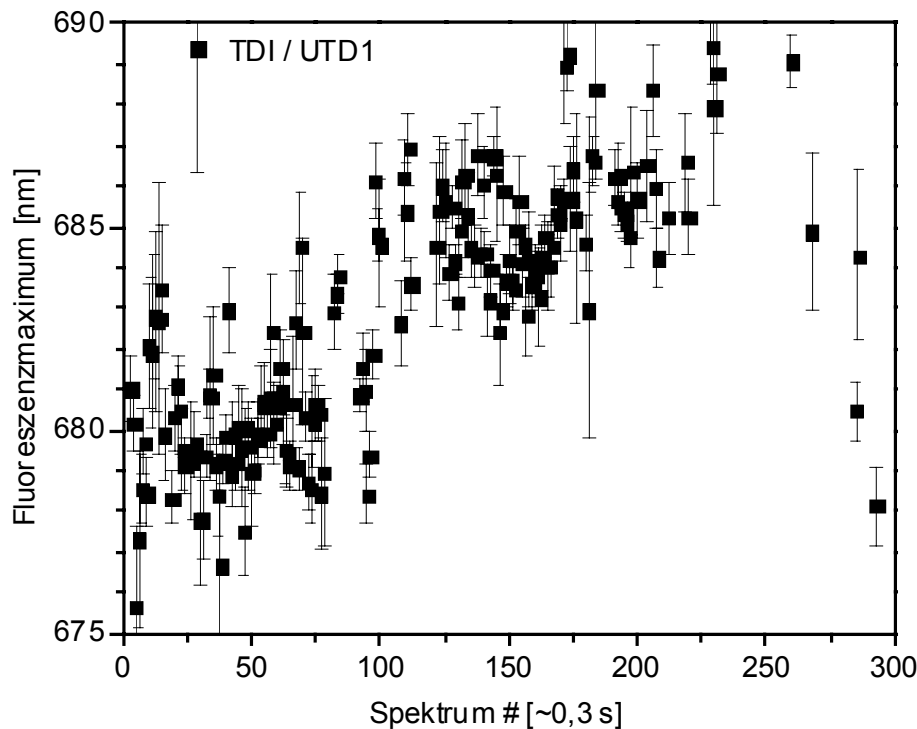


Abbildung 217: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzmaximums eines TDI Moleküls in UTD1. Nach etwa 100 Spektren verschiebt sich das Maximum langwellig um etwa 5 nm.

4.8.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt dieses Kapitel, daß die Fluoreszenzspektren von einzelnen Molekülen viel mehr Informationen enthalten als das Ensemble. Neben statischen Verschiebungen des Fluoreszenzmaximums kann fast immer auch Spektrale Diffusion beobachtet werden. Die zeitlichen Änderungen in den Fluoreszenzspektren können durch eine Änderung der Frank-Condon-Zustände beschrieben werden.

4.9 Gleichzeitige Messungen mehrerer Parameter an einzelnen Molekülen

Die verschiedenen Meßmethoden (Intensitätsdynamik, Orientierung und Fluoreszenzspektren) können auch kombiniert werden. Dafür werden die Messungen gleichzeitig durchgeführt. Einige Kombinationen sind jedoch weniger geeignet. So wird bei der Orientierungsbestimmung die Anregungsleistung aufgrund der Drehung der Anregungspolarisation stark moduliert, wodurch eine Analyse der Intensitätsdynamik schwierig wird. Die gleichzeitige Aufzeichnung von Fluoreszenzspektren dagegen ist sehr gut möglich. Dazu wird etwa 50 % des Fluoreszenzlichtes in den Spektrographen abgezweigt.

4.9.1 Fluoreszenzdynamik und Fluoreszenzspektren

Sehr gut kombinierbar ist die Aufzeichnung von Zeitspuren mit μs Zeitauflösung mit der Aufnahme von Fluoreszenzspektren. Aus den Zeitspuren können dynamische Prozesse des Farbstoffmoleküls wie die Tripletttraten mit den gleichzeitig detektierten Fluoreszenzspektren verglichen werden.

Als Testsystem wird das bewährte TDI in PMMA verwendet. Gleichzeitig zu der Aufnahme der Zeitspur mit einer Zeitauflösung von $10\ \mu\text{s}$ werden Fluoreszenzspektren im Abstand von $30,1\ \text{ms}$ detektiert. Abbildung 218 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität und die Maxima der Fluoreszenzspektren des einzelnen Moleküls.

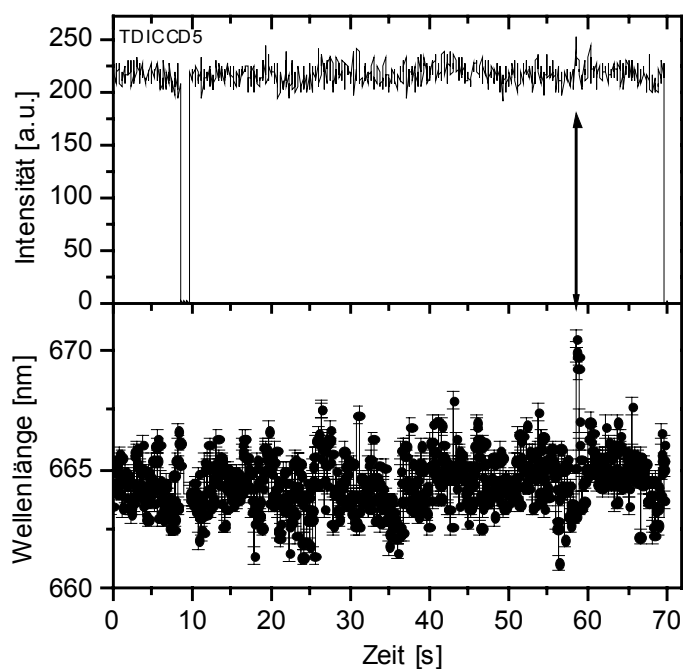


Abbildung 218: Zeitspur (oben) und Fluoreszenzmaximum (unten) eines einzelnen TDI Moleküls in PMMA. Bei etwa 9 s blinkt das Moleküls kurz, bei etwa 59 s ist ein kurzer spektraler Sprung erkennbar und nach 70 s bleicht das Molekül. ($\lambda = 633\ \text{nm}$, $34\ \mu\text{W}$ an der Probe).

Bei etwa 59 s ist deutlich eine kurze Änderung des Fluoreszenzmaximums detektierbar. In Abbildung 219 ist dieser Ausschnitt zusammen mit den entsprechenden Fluoreszenzspektren vergrößert dargestellt.

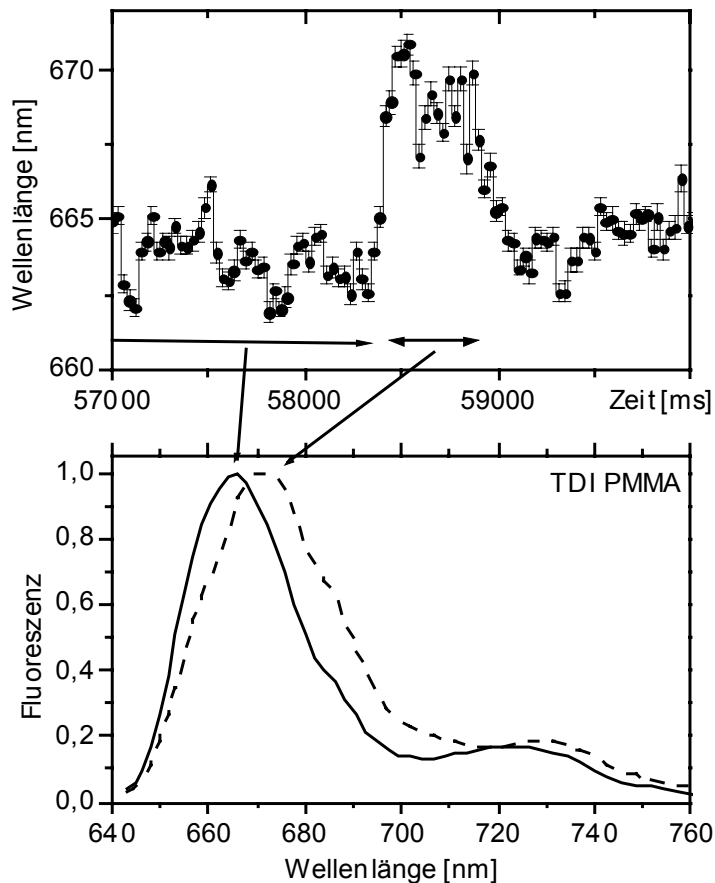


Abbildung 219: Spektraler Sprung von etwa 5 nm im Fluoreszenzspektrum von TDI, der etwa 0,5 s andauert. Oben ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzmaxima, unten sind die gemittelten Spektren vor- und während des Sprungs angegeben.

Da die Zeitspur mit einer hohen Zeitauflösung von 10 μ s aufgezeichnet wurde, können vor und während dem Spektralen Sprung die Tripletraten ermittelt werden. Dazu werden, wie im Kapitel 4.4.2 beschrieben, Histogramme von den Pausen und Anzeiten der Fluoreszenzintensität ermittelt. Abbildung 220 zeigt diese Histogramme für die gesamte Zeitspur und für die Zeit während der Änderung des Fluoreszenzspektrums.

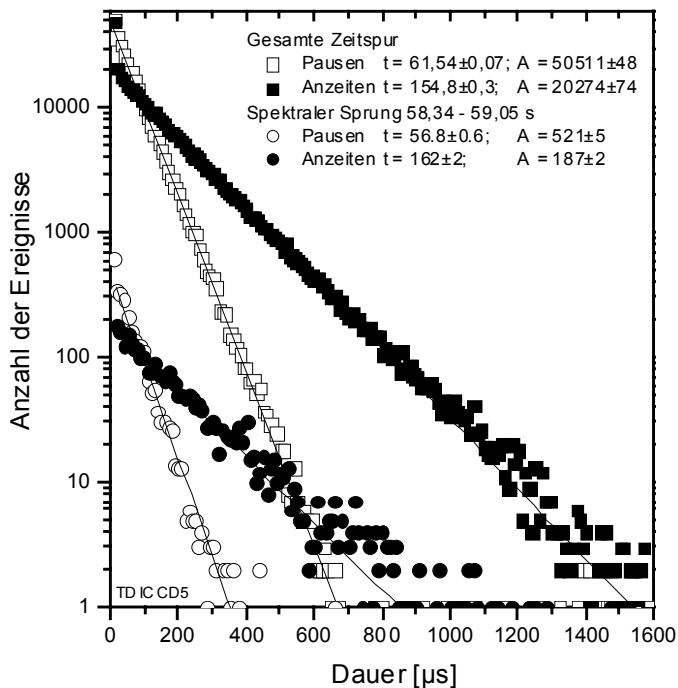


Abbildung 220: Histogramme der Anzeiten (ausgefüllte Symbole) und Auszeiten (leere Symbole) in der gesamten Zeitspur (Quadrate) und während der spektralen Änderung (Kreise). Die Meßwerte werden unter Ausschluß der ersten 3 Punkte (verfälscht durch Untergrundsignal / Poissonstatistik) monoexponentiell angepaßt.

Eine exponentielle Anpassung führt direkt zur Tripletzerfallszeit $t_{\text{aus}} = t_{31}$ und zur effektiven Triplet-Besetzungszeit t_{an} . Die Tripletzerfallszeit ist von der Anregungsrate unabhängig, so daß eine geringe, aber deutlich über dem Fehler liegende Verkürzung um 8% (von 61,5 μs auf 56,8 μs) während der spektralen Änderung nachgewiesen werden kann. Zur Berechnung der Intersystem-crossing-Rate k_{23} muß aber zusätzlich noch die Anregungsrate bekannt sein. Diese kann sich jedoch während der spektralen Änderung auch verändern, so daß eine gering veränderte Intersystem-crossing-Rate hier nicht zweifelsfrei bestimmt werden kann. Das Hauptproblem ist hier die Tatsache, daß während eines Zeitraums der Intensitätsmessung von 10 μs nur zwischen Anwesenheit und Abwesenheit von Fluoreszenzphotonen unterschieden werden kann, nicht jedoch die exakte Anzahl der Photonen. Eine Abschätzung mit einem gleichzeitig angeschlossenen Frequenzzähler, der eine mittlere Zählrate von 450 kHz an der Photodiode anzeigt, ergibt, daß während den Anzeiten des Moleküls etwa $4,5 \cdot t_{\text{an}}/t_{\text{aus}} = 11$ Photonen in 10 μs registriert werden.

Da diese Messungen sehr große Photonenraten im Bereich von 1 MHz benötigen, die bisher an Farbstoffmolekülen in den porösen Kristallen nicht erreicht werden konnten, sind von diesen Proben hier keine Resultate vorhanden. Es könnte jedoch in Zukunft versucht werden, kurze Teilstücke der Zeitspur statistisch über die Fluoreszenzkorrelationsfunktion zu analysieren, um damit Änderungen in der Triplettdynamik zu bestimmen.

4.9.2 Orientierung und Fluoreszenzspektren

Auch zur gleichzeitigen Aufnahme von Moleküllorientierung und Fluoreszenzspektrum wird das Fluoreszenzlicht in zwei gleichstarke Strahlen aufgeteilt und von der SAPD und dem Prismenspektrographen detektiert. Um zu vermeiden, daß die Spektren durch eine unterschiedliche Anregungspolarisation beeinflusst werden, wird die Spektrenaufnahme so synchronisiert, daß in jeder Polarisationsdrehung genau ein Spektrum aufgezeichnet wird. Dazu wird des elektrische Signal des Transmissionsdetektors von einem Oszillographen (Tektronix2465B) verfolgt, dessen Triggerung so eingestellt wird, daß jede Periode zu einem Triggerereignis führt. Der TTL Ausgang der Triggerung wird mit dem Sync-Eingang der CCD Kamera verbunden. Dadurch kann erreicht werden, daß in jeder Periode ein Triggerereignis auslöst wird, welches dazu führt, daß ein Spektrum ausgelesen wird. Die Zeit für eine Polarisationsperiode und damit für ein Fluoreszenzspektrum beträgt etwa 400 ms. Abbildung 221 zeigt den schematischen Aufbau.

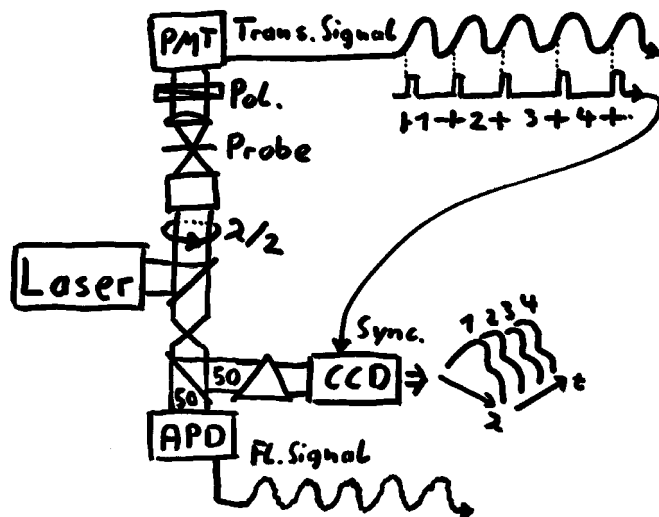


Abbildung 221: Schematischer Aufbau zum synchronisiertem Messen von Orientierung und Fluoreszenzspektrum.

4.9.2.1 TDI im Monolith

Neben den diffundierenden TDI Molekülen, treten im M41S Monolith zu etwa 10% immobile Moleküle auf, von denen 22 eingehend untersucht wurden. Nur in zwei Fällen konnte entweder eine spektrale Änderung oder eine Umorientierung detektiert werden. Die gleichzeitige Änderung von Orientierung und Fluoreszenzspektrum ist in nur einer statistisch unsicheren Messung aufgetreten. Dagegen sind mehrere Gegenbeispiele vorhanden, die keine Korrelation zwischen Orientierung und Spektrum zeigen. Abbildung 222 zeigt den zeitlichen Verlauf der Orientierung und der Maxima der Fluoreszenzspektren eines einzelnen TDI Moleküls im M41S Monolith.

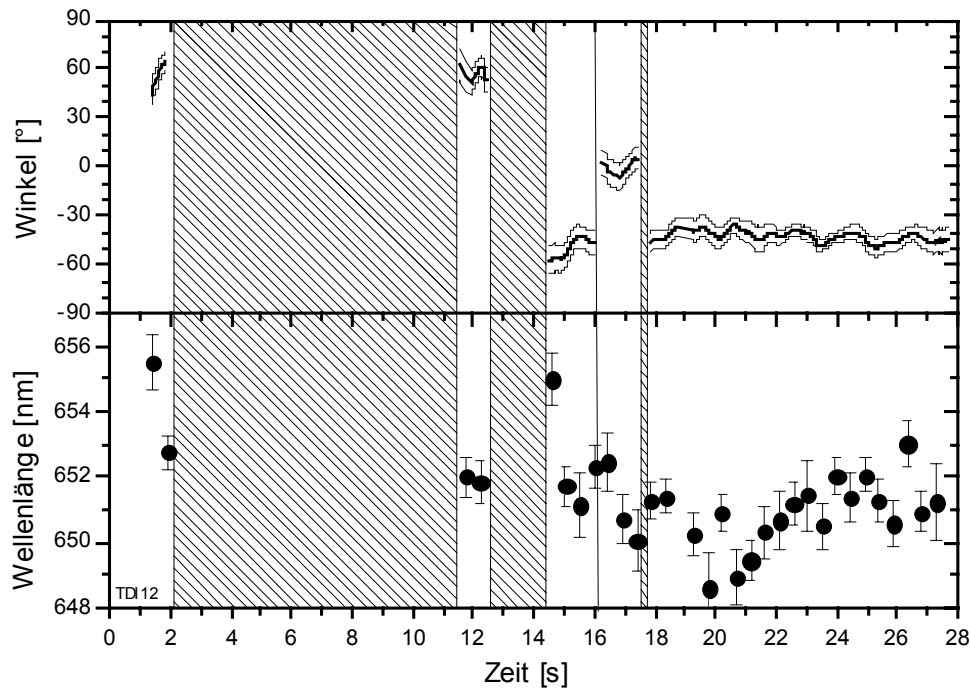


Abbildung 222: Zeitlicher Verlauf der Orientierung und der Fluoreszenzmaxima eines nicht diffundierenden TDI-Moleküls im M41S Monolith. Zu den schraffierten Zeiten befand sich das Molekül in einen Auszustand. Die beiden dünnen Linien über und unter der Orientierungskurve geben die Bestimmungsgenauigkeit an.

Das Molekül, das auch dreimal blinkt, kann in mindestens drei verschiedenen Orientierungen detektiert werden. Bei 16 s und 17,5 s sind deutliche Umorientierungen vorhanden, die nicht mit einer signifikanten Änderung der Fluoreszenzspektren korrelieren. Dagegen sind zwischen 18 s und dem irreversiblen Bleichen bei 28 s einige spektrale Änderungen auszumachen, die aber wiederum mit keiner signifikanten Drehung des Moleküls zusammenhängen. Die Originalmeßkurve mit den beiden Umorientierungen bei 16 s und 17,5 s ist in Abbildung 223 dargestellt.

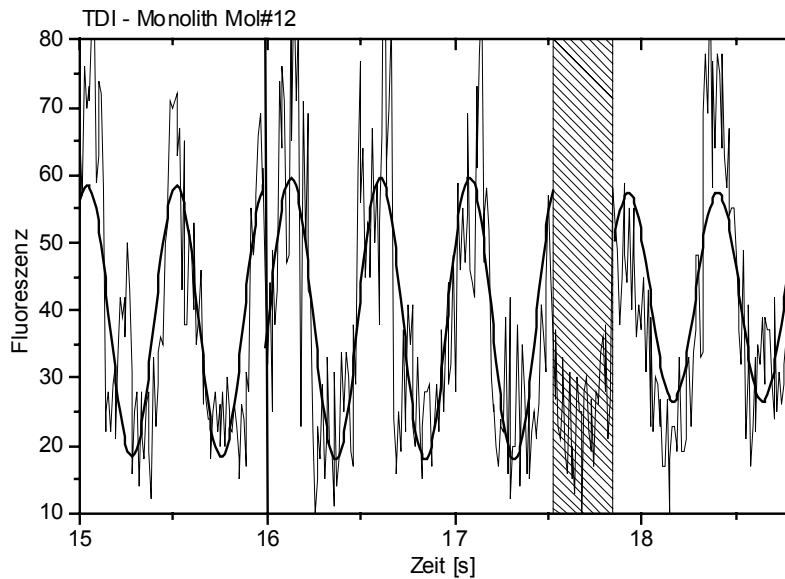


Abbildung 223: Fluoreszenzzeitpur der Orientierungsmessung (dünne Linie) mit den drei verschiedenen phasenverschobenen Orientierungen des Moleküls (dicke Linien).

Bei einem anderen Molekül ist nach 17 s ein deutlicher Sprung im Fluoreszenzspektrum erkennbar (siehe Abbildung 224).

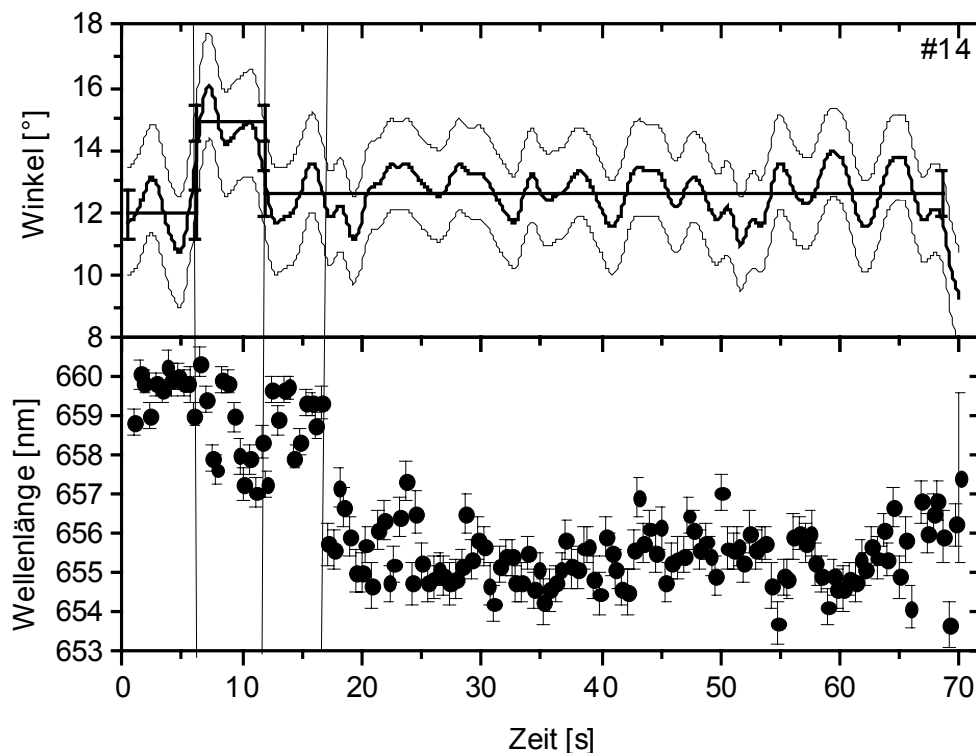


Abbildung 224: Zeitlicher Verlauf der Orientierung und der Fluoreszenzmaxima eines nicht diffundierenden TDI-Moleküls im M41S Monolith. Die beiden dünnen Linien über und unter der Orientierungskurve geben die Bestimmungsgenauigkeit an. Bei 12 s ist der unsichere Fall einer Korrelation zwischen 2,5° Umorientierung und 2 nm spektraler Änderung.

Doch auch in diesem Fall ist keine Umorientierung zum gleichen Zeitpunkt nachweisbar. Wenige Sekunden vorher war vermutlich eine sehr geringe Orientierungsänderung von $2,5^\circ$ vorhanden, die beim Rücksprung bei 12 s mit einer geringen Verschiebung des Fluoreszenzspektrum verbunden ist. Die gute Winkelauflösung ist leider mit einer verschlechterten Zeitauflösung verbunden, da dann die Kurvenanpassung über einen größeren Zeitraum vorgenommen wird. Dadurch verbreitern sich die möglicherweise sehr schnellen Winkeländerungen bei 6 s und 12 s auf einen Zeitraum von etwa 1 s.

4.9.2.2 Oxazin-1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$

Es konnte keine Zeitspur einer Orientierungsänderung gleichzeitig mit den Fluoreszenzspektren von Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ aufgezeichnet werden. Von den beiden festgestellten Umorientierungen in Kapitel 4.6.6 existieren leider keine Fluoreszenzspektren. Auch während dem einen, 26 nm weiten spektralen Sprung in Kapitel 4.8.4 sind keine Orientierungsdaten vorhanden. In den Meßdaten von 20 Molekülen, die gleichzeitig auf ihre Orientierung und ihr Fluoreszenzspektrum untersucht wurden, ist leider keine einzige deutliche Umorientierung registriert worden.

Schwache spektrale Änderungen werden jedoch öfters beobachtet. Abbildung 225 zeigt ein Oxazin 1 Molekül, das z.B. bei 30 s signifikante Änderungen im Fluoreszenzspektrum aufweist. Jedoch ist zu diesem Zeitpunkt in der Orientierung des Moleküls mit einer Genauigkeit von $\sim 10^\circ$ keine Änderung feststellbar.

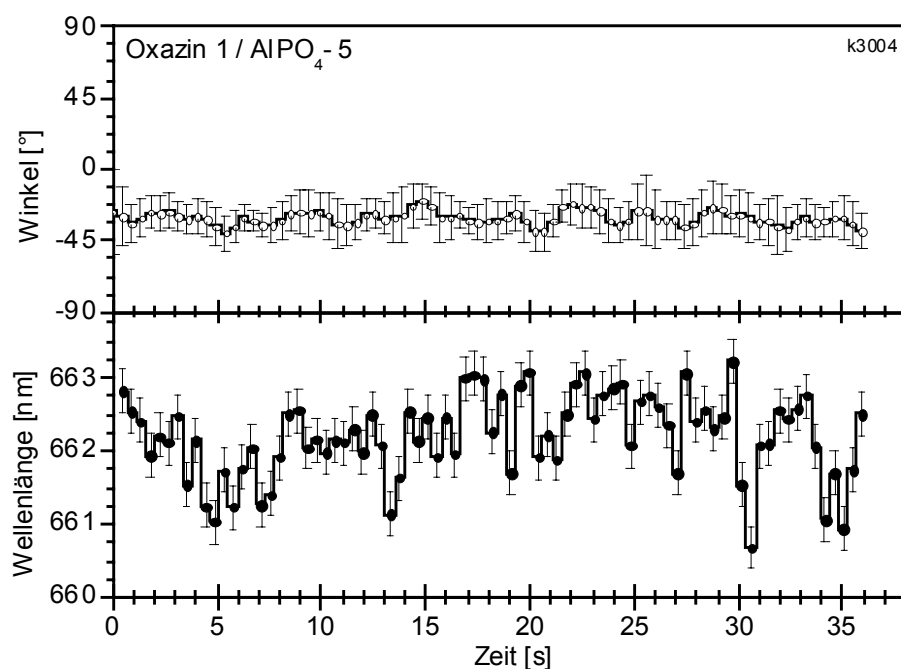


Abbildung 225: Zeitlicher Verlauf der Orientierung und des Fluoreszenzmaximums eines einzelnen Oxazin 1 Moleküls in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Der Orientierungswinkel kann in Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit von 10° als konstant angesehen werden. Geringe Änderungen des Fluoreszenzmaximums sind jedoch vorhanden (z.B. bei 30 s, 34 s).

In einem Fall kann jedoch ein deutlicher spektraler Sprung eines Oxazin 1 Moleküls von +20 nm beobachtet werden (siehe Abbildung 226).

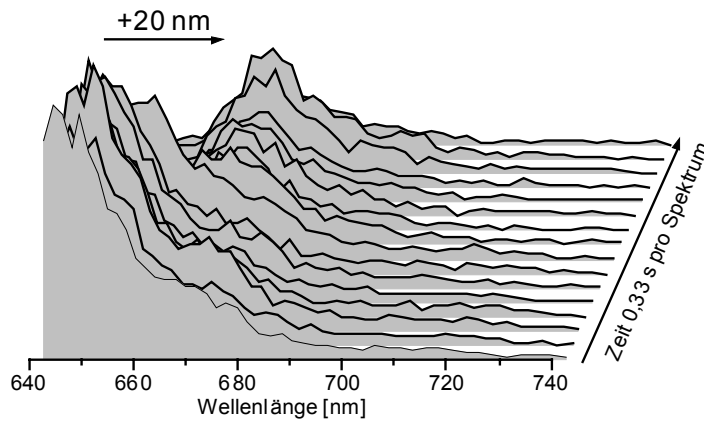


Abbildung 226: Spektraler Sprung von 20 nm eines einzelnen Oxazin 1 Moleküls in $\text{AlPO}_4\text{-5}$.

Obwohl sich die Gesamtintensität der Fluoreszenzspektren nach dem Sprung fast halbiert, kann das Vorhandensein von zwei Molekülen ausgeschlossen werden, da sich bei ~ 670 nm die Fluoreszenzintensität nach dem Sprung sogar erhöht.

Doch kann auch hier gleichzeitig zum spektralen Sprung keine Umorientierung beobachtet werden. Mit einer Genauigkeit von $\pm 3^\circ$ bleibt die Orientierung des Moleküls während der Änderung in Fluoreszenzspektrum konstant (siehe Abbildung 227)

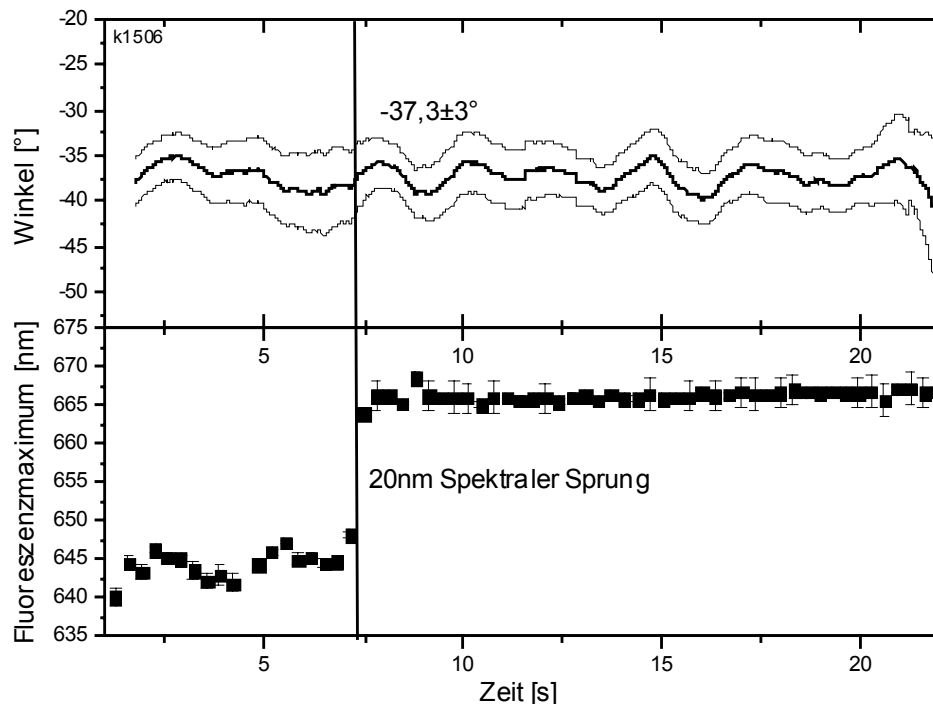


Abbildung 227: Gleichzeitige Detektion von Orientierung und Fluoreszenzspektren von Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$. Während dem spektralen Sprung von 20 nm bleibt die Orientierung des Moleküls mit einer Genauigkeit von $\pm 3^\circ$ konstant.

Eine Erklärung für dieses Verhalten ist die Bewegung des Gegenions des kationischen Farbstoffes. Nach Abschätzungen von R. Brown [Brown] hat bei geladenen Farbstoffen die Lage des Gegenions einen großen Einfluß auf die Fluoreszenzeigenschaften. Dies wird derzeit im Rahmen einer Kooperation untersucht.

4.9.3 Zusammenfassung

Bei der Umorientierung eines Farbstoffmoleküls muß sich auch die Umgebung neu verteilen. In der neuen Position muß Platz geschaffen werden, während die alte Position mit Material aus der Umgebung aufgefüllt wird. Dadurch kann erwartet werden, daß sich durch die geänderte Umgebung auch die Übergangsenergie des Moleküls ändert. Bei unpolaren Farbstoffen ist jedoch nur eine geringe Wechselwirkung mit der Umgebung vorhanden, womit die geringen spektralen Änderungen bei der Umorientierung von TDI in dem M41S Monolithen gut erklärt werden können. Jedoch sollten ionische Farbstoffe eine starke Wechselwirkung mit ihrer polaren Umgebung besitzen und daher empfindlich auf eine veränderte Ladungsverteilung der Umgebung reagieren. Hier konnte gezeigt werden, daß die beobachteten spektralen Sprünge von Oxazin 1 in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ nicht mit einer signifikanten Winkeländerung korreliert sind. Zwar sind nur wenige Beispiele vorhanden, doch schon damit kann gezeigt werden, daß gleichzeitige Änderungen wohl eher die Ausnahme sind. Dies bedeutet, daß ein Einfluß der Umgebung nicht für diese spektralen Sprünge verantwortlich gemacht werden kann.

5 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden auch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an GFP bei tiefen Temperaturen durchgeführt, von denen einige Ergebnisse hier kurz vorgestellt werden. Bei kryogenen Temperaturen werden fast alle Freiheitsgrade des Protein eingefroren, so daß auch metastabile Zustände beobachtet werden können. Neben der Stabilisierung durch tiefe Temperaturen können die verschiedenen Zustände von GFP auch genetisch stabilisiert werden. Verschiedene genetisch stabilisierte Zustände können mit der Tieftemperaturspektroskopie deutlich identifiziert und charakterisiert werden, da die Spektren schmaler und besser aufgelöst werden. Schließlich können die Zerfallsprozesse von metastabilen Zuständen durch temperaturabhängige Beobachtungen charakterisiert und deren Energiebarrieren bestimmt werden.

5.1 Grundlagen von GFP

Das Besondere an GFP ist die Eigenschaft, daß die Fluoreszenz allein von der Aminosäuresequenz bestimmt wird. Dadurch ist es genetisch codierbar und kann über gentechnische Methoden in den verschiedensten Zellen exprimiert werden [Chalfie1994]. Mittlerweile sind durch genetische Mutationen Varianten hergestellt worden, die fast den gesamten sichtbaren Spektralbereich abdecken. GFP hat dadurch die Molekularbiologie revolutioniert und wird mittlerweile in einer unüberschaubaren Anzahl von Anwendungen eingesetzt [Stearns1995] [Tsien1998].

Das GFP stammt aus der pazifischen Qualle *Aequoera victoria*, in der das Protein blaue Emission aus den chemilumineszenten Photoprotein Aequorin in grüne Biolumineszenz verwandelt

5.1.1 Proteinstruktur

Die Struktur des GFP wurde durch Röntgenstrukturanalyse gelöst [Brejc1997]. Sie zeigt, daß der Chromophor in einem zylindrischen 'Faß' aus 11 β Faltblattsträngen eingepackt ist (siehe Abbildung 228).



Abbildung 228: Tertiärstruktur von GFP (Bandmodell). Der Chromophor (Kalottenmodell) befindet sich im Inneren der faßartigen Struktur.

Das Faß ist etwa 4 nm hoch und hat einen Durchmesser von 2 nm. Eine zentrale α Helix enthält den Chromophor, der aus drei Aminosäuren Ser(65)-Tyr(66)-Gly(67) durch Kondensation und Oxidation gebildet wird [Niwa1996]. Der freie Chromophor besitzt nur eine extrem geringe Fluoreszenzquantenausbeute. Erst aufgrund der Fixierung in der Tertiärstruktur kann die hohe Fluoreszenzquantenausbeute von etwa 70 % erreicht werden.

5.1.2 Photophysik von GFP

Die elektronischen Zustände des Chromophors wurden von Boxer et al. [Chattoraj1996] und Michel-Beyerle et al. [Lossau1996] durch Kurzzeitspektroskopie und Tieftemperatur Untersuchungen aufgeklärt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse und eine Interpretation der Röntgenstrukturen findet sich in Brejc et al. [Brejc1997]. Drei verschiedene Zustände des Chromophors können auftreten (siehe Abbildung 229). Der protonierte Zustand A absorbiert blaues Licht bei 400 nm. Der angeregte Zustand A* fluoresziert jedoch nur sehr schwach, da er sehr schnell das Proton der Phenylgruppe von Tyr66 abgibt und sich dadurch in den deprotonierten Zustand I* umwandelt. Diese Umwandlung wird als 'Excited State Proton Transfer' (ESPT) bezeichnet. Die überwiegende Fluoreszenz stammt somit nicht von A*, sondern von I*. Der Grundzustand I zerfällt anschließend meist wieder in die den Grundzustand A. Daneben existiert noch ein stabiler anionischer Zustand B, der mit blaugrünem Licht bei 470 nm angeregt werden kann und etwa die gleiche grüne Fluoreszenz besitzt wie der I* Zustand. Der I Zustand ist die nicht relaxierte Form des B Zustandes.

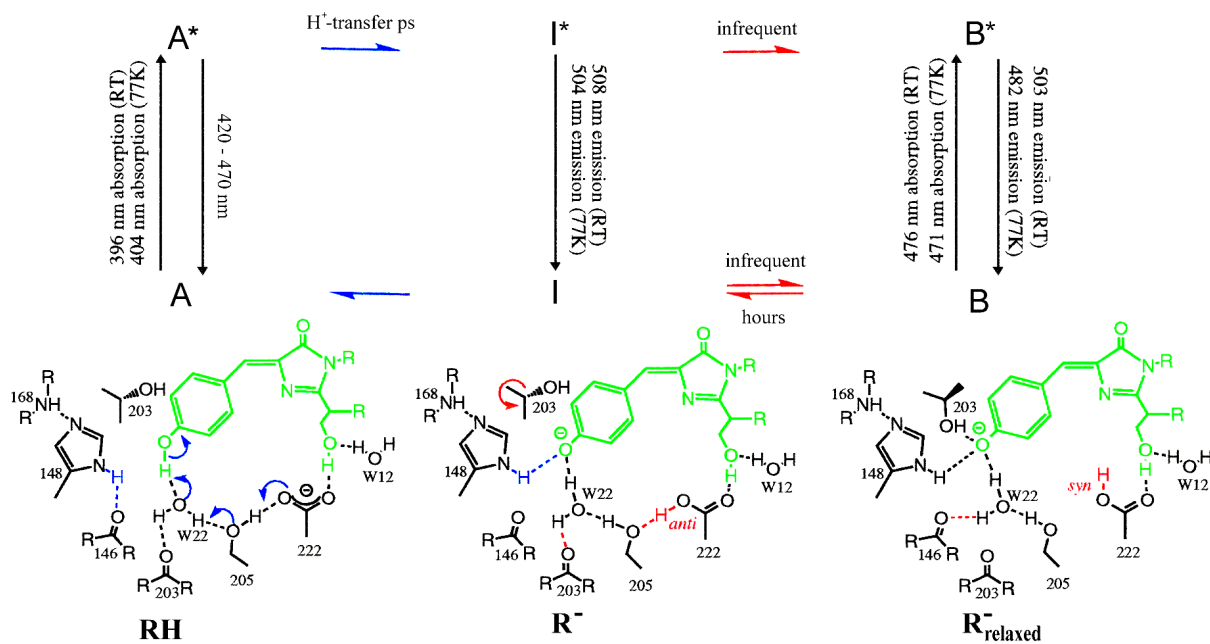


Abbildung 229: Drei Zustände beschreiben das Fluoreszenzverhalten von GFP. Der protonierte Zustand RH (A), dessen deprotonierter Zustand, der nach dem ESPT gebildet wird (I) und der relaxierte deprotonierte Zustand (B). Modifiziert aus [Brejc1997].

Der Gleichgewichtszustand zwischen A, I und B ist von äußeren Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Proteinkonzentration und genetischen Mutationen in der Chromophorumgebung abhängig [Ward1982] [Lossau1996] [Wiehler2002].

Tieftemperaturuntersuchungen an GFP wurde bisher bei Temperaturen über 77 K [Chattoraj1996] [Lossau1996] [Thor2002] und bei 2 K [Seebacher1999] [Creemers1999] [Creemers2000] durchgeführt. Ziel der Untersuchungen bei tiefen Temperaturen ist es verschiedene (stabile und metastabile) Zustände zu identifizieren und hinsichtlich ihrer spektralen und dynamischen Eigenschaften zu charakterisieren.

5.1.3 Theorie zur Tieftemperaturspektroskopie

Abbildung 230 zeigt schematisch die Form der Absorptions- und Emissionsspektren eines einzelnen Moleküls oder Subensembles und des inhomogen verbreiterten Ensembles bei sehr tiefen Temperaturen.

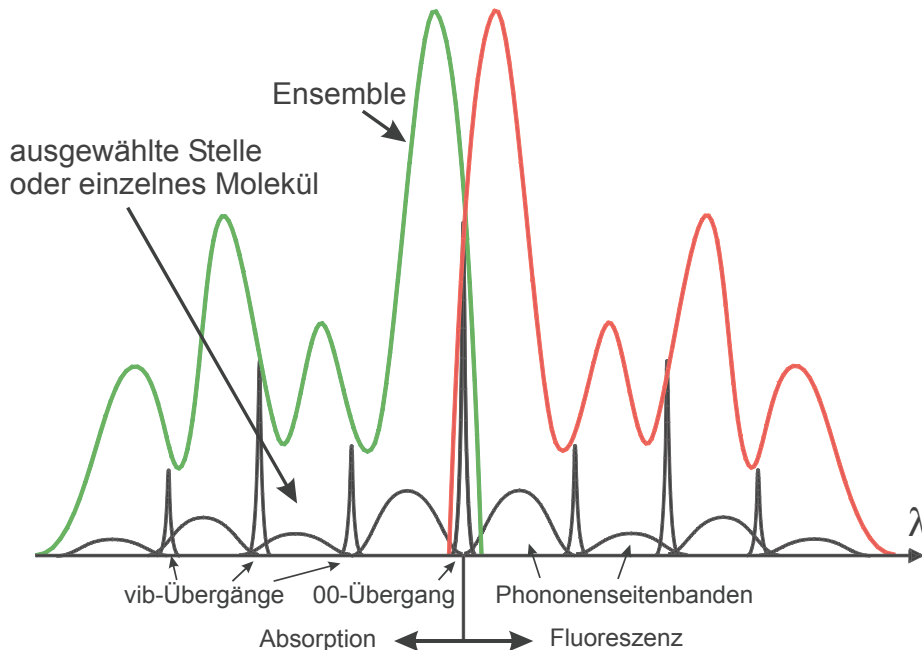


Abbildung 230: Absorptions- und Fluoreszenzspektren bei tiefen Temperaturen. Die elektronischen Übergänge können bei tiefen Temperaturen sehr schmal werden (untere schmale Linien). Jedoch können immer noch einige Gitterschwingungen (Phononen) an die Übergänge ankoppeln. Im Ensemble überlagern sich geringfügig verschiedene elektronische Linien zu einem breiten Spektrum (obere breite Linien).

Bei tiefen Temperaturen können die elektronischen Übergänge sehr schmal werden, da die Kopplung an die Gitterschwingungen der Umgebung (Phononen) verringert wird. Jedoch bleibt in den meisten Materialien im Ensemble eine gaußförmige Verbreiterung der Banden erhalten, die durch den nicht perfekt homogenen Einbau in den Festkörper hervorgerufen wird. Um diese inhomogene Verbreiterung zu überwinden, können neben der Tieftemperatur-Einzelmolekülspektroskopie und der kohärenten Technik des Photonenechos, auch Subensemble mittels spektralem Lochbrennen oder Fluoreszenzlinienverschmälerung selektiert werden. Eine Übersicht über die verschiedenen Methoden und Meßmöglichkeiten bietet der Artikel von Skinner und Moerner [Skinner1996].

Beim spektralen Lochbrennen und der Fluoreszenzlinienverschmälerung (fluorescence line narrowing, FLN) wird mit sehr schmalbandigen Lasern ein Subensemble selektiert (unteres Spektrum in Abbildung 230). Dazu wird die Probe in der Gegend der 00-Übergänge bestrahlt. Das Fluoreszenzspektrum dieses Subensembles besitzt, neben den breiten Phononenbanden, schmale Linien der vibronischen Übergänge. Ein Beispiel für solch ein FLN-Spektrum ist in Abbildung 234 dargestellt. Bleicht der Farbstoff beim Bestrahlen, so entsteht ein spektrales Loch, das bei der Aufnahme eines Absorptions- oder Fluoreszenzanregungsspektrum detektiert werden kann. Ein Beispiel für ein spektrales Loch ist in Abbildung 233 angegeben.

5.2 Experimenteller Aufbau

In einem Helium Durchfluß-Kryostaten (Cryovac 5-07-2055B) werden bei etwa 2 K und 1 mBar He Druck Fluoreszenzanregungs- (FLA) und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Für eine ausführliche Behandlung und Details zum Meßaufbau siehe [Augustin1998] [Seebacher1997].

5.2.1 Probensystem

Die hier verwendeten Proteine wurden von Jens Wiehler im Genzentrum der LMU-München gentechnisch hergestellt und gereinigt [Wiehler2001]. Die Proben werden auf eine Konzentration von etwa 10^{-6} mol/l in 65% Glycerin zu 35% wäßrige Pufferlösung pH 6,5 verdünnt und in Quarzküvetten (abgeschmolzene Quarzrohre) gefüllt. Die ersten Messungen wurden in 1 mm dicken Glasküvetten (Vitro-Dynamics) durchgeführt. Diese zeigen jedoch bei 377 nm eine schwach fluoreszierende Absorption. Außerdem wurde an diesen Küvetten eine unerwünschte Energiespeicherung beobachtet, die dazu führt, daß beim Aufwärmen einer zuvor mit 364 nm Licht bestrahlten Küvette, ein Leuchten auftritt.

5.2.2 Fluoreszenzanregungsspektren (FLA)

Abbildung 231 zeigt den Aufbau für Fluoreszenzanregungsspektren.

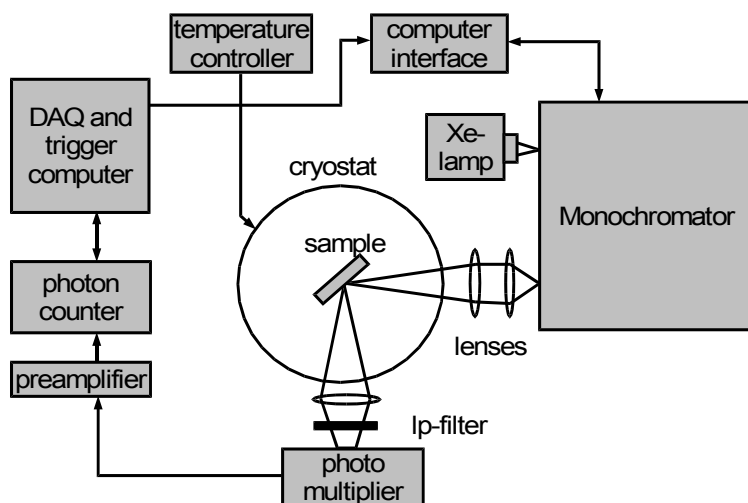


Abbildung 231: Aufbau zur Detektion von Tieftemperatur-Fluoreszenzanregungsspektren.

Für die Fluoreszenzanregungsspektren wird das Licht einer Xe-Bogenlampe (150 W Oriel 66002) mit einem Doppelmonochromator (Spex 1402 mit CD2B-Steuerung) selektiert und auf die Probe gestrahlt. Die Linienbreite des Anregungslichtes beträgt etwa 0,03 nm. Unter einem Winkel von 90° wird das Fluoreszenzlicht eingesammelt, und mit einem passenden Langpassfilter vom Anregungslicht abgetrennt. Bei der Verwendung des Orangeglas Filters (OG550) kann bis zu einer Anregungswellenlänge von 530 nm gemessen werden. Die Detektion erfolgt mit einem gekühlten Photomultiplier (RCA C31034A), dessen Charakteristik über den gesamten sichtbaren Bereich sehr gleichmäßig verläuft und einem Photonen Zähler (Stanford Research Systems SRS 400).

5.2.3 Fluoreszenzspektren

Abbildung 232 zeigt den Aufbau für Fluoreszenzspektren.

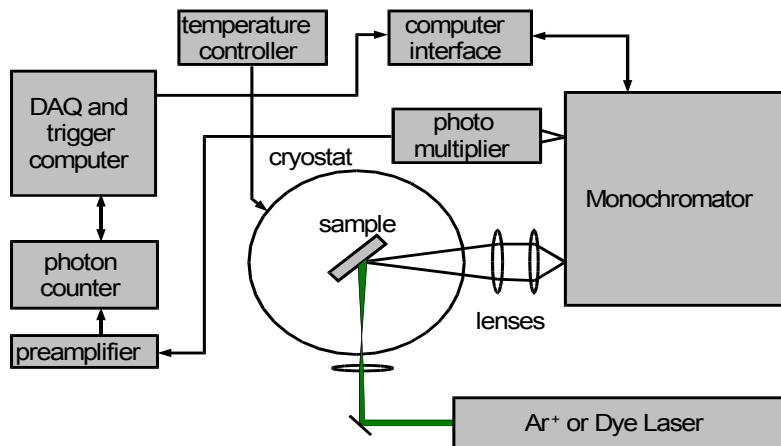


Abbildung 232: Aufbau zur Detektion von Tieftemperatur-Fluoreszenzspektren.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wird die Probe mit einem schwachen Strahl aus einem Laser bestrahlt. Die Fluoreszenz wird unter einem Winkel von 90° eingesammelt und mit einem Doppelmonochromator (Spex 1402) mit einer Auflösung von etwa 0,03 nm aufgetrennt. Zur Detektion dient wieder das zuvor erwähnte Photonen-Zählsystem.

5.2.4 Temperatur-Ableitungs-Spektroskopie

Eine Methode, um die Verteilung der Barrieren eines aktivierten Prozesses zu untersuchen, ist die Temperatur-Ableitungs-Spektroskopie (Temperature-derivative spectroscopy: TDS) [Berendzen1990]. Diese wird hier verwendet, um die thermische Stabilität von metastabilen GFP-Zuständen zu bestimmen [Seebacher1999]. Wie von Köhler und Friedrich gezeigt wurde [Köhler1987], kann die Verteilung der Barrieren aus einem Aufheizexperiment bestimmt werden. Im einfachsten Modell nach Arrhenius ist die Geschwindigkeit einer thermisch aktivierten Reaktion von der Höhe der Barriere H und dem präexponentiellen Faktor K_0 abhängig:

$$K = K_0 \cdot e^{\frac{-H}{k_b \cdot T}} \quad (95)$$

Bei einer Temperatur T werden daher nur diejenigen Barrieren überwunden, für die $1/K$ kleiner ist als die experimentelle Zeit τ . k_b ist die Boltzmannkonstante. Die maximale Barrierenhöhe H_T , die bei der Temperatur T in der experimentellen Zeit τ überwunden werden kann, ist demnach:

$$H_T = k_b \cdot T \cdot \ln(K_0 \tau) \quad (96)$$

Man kann zeigen, daß die Parameter τ und K_0 aufgrund des \ln nur einen sehr geringen Einfluß auf die Barrierenhöhe besitzen. Unter der Annahme eines Arrhenius-Faktors K_0 von 10^{12} s^{-1} (typische Schwingungsfrequenz) und einer

experimentellen Zeit von $\tau = 70$ s (typische Aufheizraten sind 1/7 K/s) ergibt sich ein Zusammenhang von

$$H_T \approx 32 \cdot k_b T \quad (97)$$

Nach dieser Gleichung kann die Temperaturskala in eine Energieskala umgerechnet werden.

Beobachtet man das Verschwinden eines fluoreszierenden Zustandes, so wird dessen Signal von den noch nicht zerfallenen Molekülen gebildet. Es ergibt sich ein temperaturabhängiges Signal $S(T)$, aus dem die Verteilung der Barrieren $f(H)$ durch Bildung der negativen Ableitung bestimmt werden kann.

$$S(T) = 1 - \int_0^{H_T} f(H) dH \quad (98)$$

Experimentelle Beispiele für diese Methode sind in Kapitel 5.3.2.3 aufgeführt.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Spektrales Lochbrennen

Hochaufgelöste Tieftemperaturspektroskopie ist nur bei relativ schwacher Elektron-Phonon-Kopplung möglich [Friedrich1980]. Daher soll hier GFP auf die Möglichkeit von spektralem Lochbrennen untersucht werden. Dazu wird die Probe bei einer Temperatur von 2 K mit einer Laserlinie eines Ar-Ionen, Kr-Ionen oder He-Cd Lasers bestrahlt.

Versuche bei einer Bestrahlung mit 442 nm, 472,7 nm und 476,5 nm spektrale Löcher zu brennen, blieben ohne Erfolg. Hier kann nur das gesamte Bleichen der Probe detektiert werden. Lediglich nach der intensiver Bestrahlung mit 482,5 nm (30 Minuten mit 16 mW/cm^2) konnte ein spektrales Loch detektiert werden (siehe Abbildung 233).

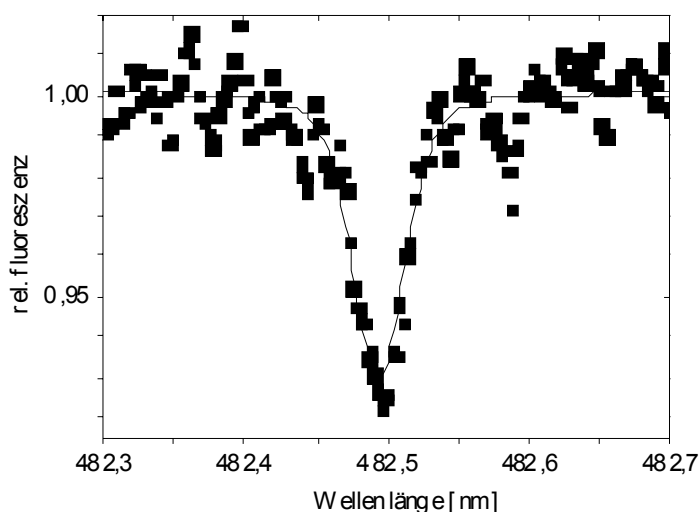


Abbildung 233: Permanentes spektrales Loch in der Bande des B-Chromophors von wt-GFP bei 2 K. Das Loch wurde mit einem Kr-Ionen-Laser mit 482,5 nm in 30 Minuten mit 16 mW/cm^2 gebrannt. Die Breite des detektierten Loches von 0,03 nm ist durch die Auflösung des Doppelmonochromators beschränkt.

Auch in den Untersuchungen von Creemers et al. [Creemers1999] bei 1,6 K konnte mit einem durchstimmbaren Farbstofflaser nur bei 434 nm, 477 nm und 495 nm spektrales Lochbrennen beobachtet werden.

Dies zeigt, daß bei 2 K immer noch eine sehr starke Kopplung zwischen dem elektronischen Übergang und den Phononen der Festkörperumgebung besteht [Friedrich1980]. Nur an wenigen Stellen sind genügend 00-Linien vorhanden, die spektrales Lochbrennen erlauben. Weiterführende Untersuchungen, die z.B. temperaturabhängig die Lochbreite bestimmen, um die spektrale Diffusion zu charakterisieren, sind bisher nicht durchgeführt worden.

An einigen Stellen kann auch Fluoreszenzlinienvershmälerung (FLN) beobachtet werden. So zeigt z.B. das Fluoreszenzspektrum des Photoprodukts der GFP Variante Thr203Val einige scharfe Linien (siehe Abbildung 234).

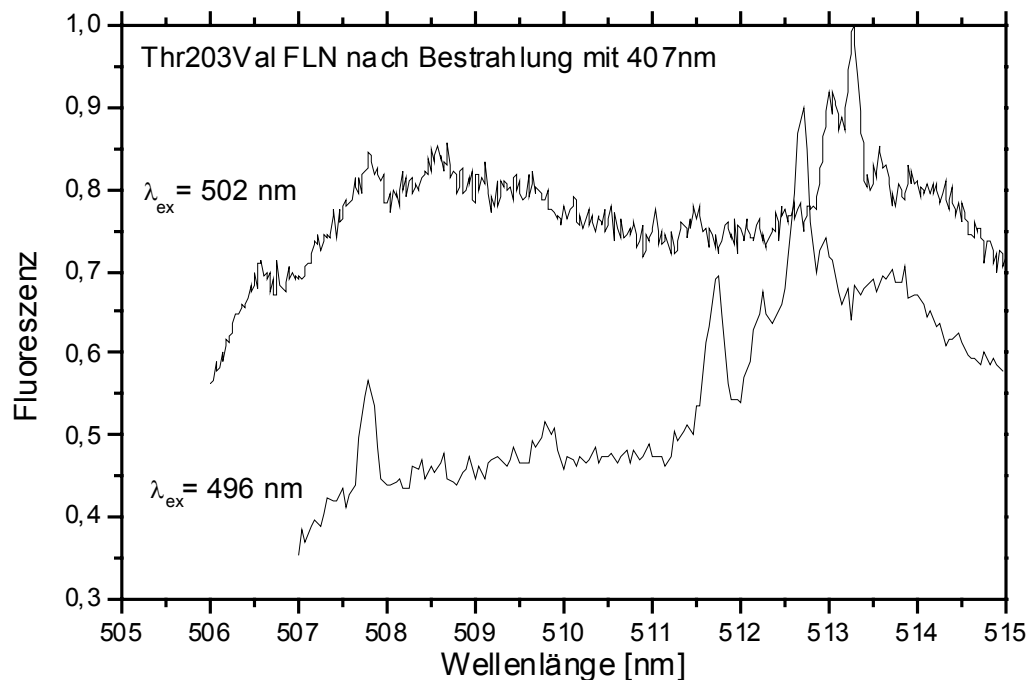


Abbildung 234: Fluoreszenzlinienvershmälerung an Thr203Val.

Jedoch ist die Zuordnung der scharfen Fluoreszenzlinien zu den Schwingungsbanden sehr schwierig, da in diesem Bereich bis zu 3 anregbare Zustände (497 nm, 506 nm und 512 nm) vorhanden sind. Da sich mit unterschiedlicher Anregung auch unterschiedliche Signale ergeben, können Störungen durch das Plasma des Ar-Ionen Lasers aber ausgeschlossen werden.

5.3.2 Wildtyp-GFP Photoprodukte

Nach der intensiven Bestrahlung mit Laserlicht, die ursprünglich nur zum Brennen von spektralen Löchern verwendet wurde, konnte bei 2 K aber die Bildung von Photoprodukten beobachtet werden.

5.3.2.1 Bestrahlung des A Chromophors

Bei intensiver Bestrahlung der blauen Absorptionsbande (A) bilden sich zwei Photoprodukte bei 501 nm (P501) und 510 nm (P510) (siehe Abbildung 235).

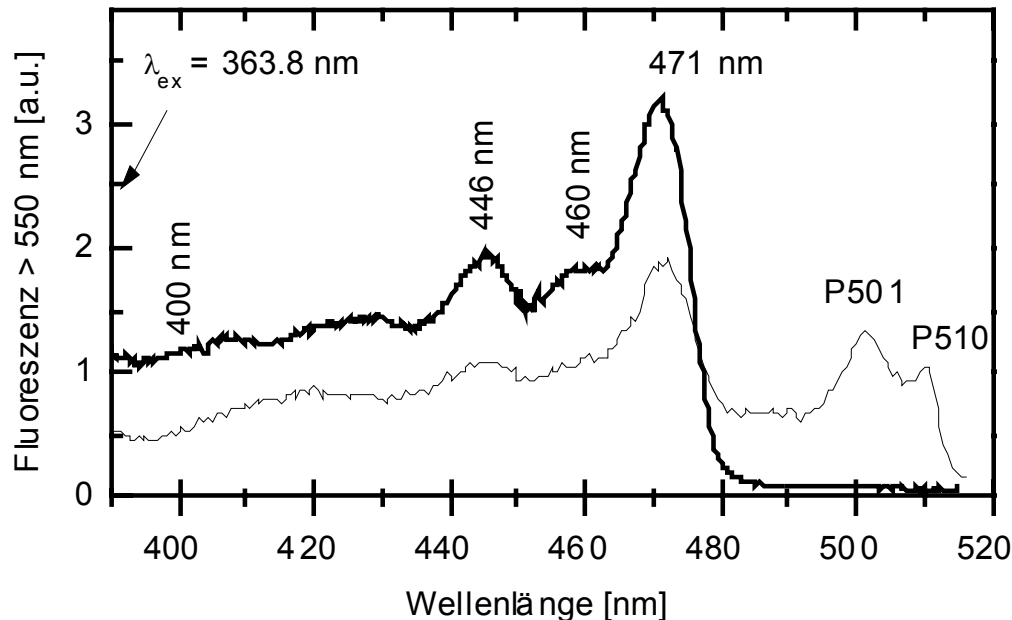


Abbildung 235: Fluoreszenzanregungsspektren vor (dünn), und nach (breit) intensiver Bestrahlung des A-Chromophors mit 363,8 nm Licht (30 mW/cm^2 , 240 min). Es bilden sich zwei Photoprodukte bei 501 nm und 510 nm.

Hier wurde der protonierte Chromophor (A) sehr weit im blauen Spektralbereich mit Licht aus dem Ar-Ionen-Laser bei 364 nm bestrahlt, um den deprotonierten Chromophor (B) möglichst wenig über dessen Schwingungsbanden anzuregen. Bei einer Bestrahlung mit 407 nm bilden sich auch diese beiden Photoprodukte. Jedoch wird dann gleichzeitig auch das in Kapitel 5.3.2.2 beschriebene Photoprodukt P489 des (B) Chromophors gebildet. Daß es sich bei P501 und P510 um zwei verschiedene Photoprodukte handelt, kann z.B. anhand der verschiedenen Zerfallstemperaturen in Kapitel 5.3.2.3 gezeigt werden. Das Fluoreszenzspektrum des P501 besitzt ein Maximum bei etwa 505 nm. Dies liegt sehr nahe an dem Fluoreszenzmaximum I* des Chromophors (A) nach den Protonentransfer mit 503 nm (siehe Abbildung 236). Daher wird vermutet, daß das Photoprodukt P501 mit der I-Form des Chromophors identisch ist.

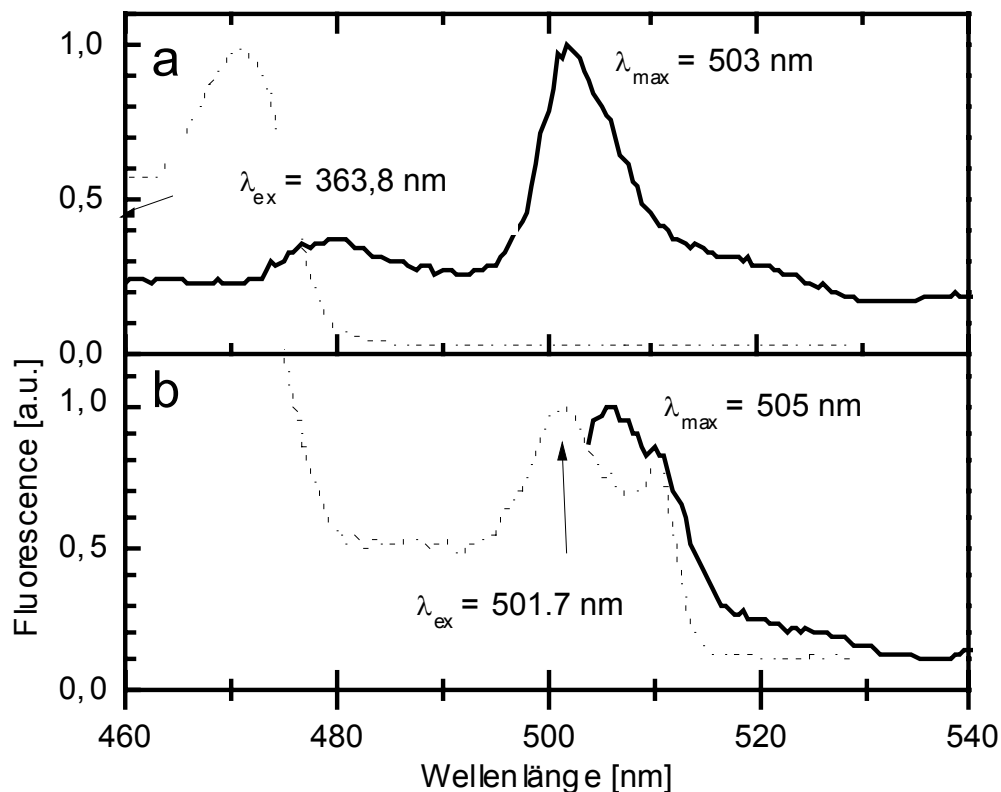


Abbildung 236: Fluoreszenzspektren von wt-GFP bei 2 K. Das Fluoreszenzmaximum bei Bestrahlung des protonierten Chromophors A (oben, breite Linie) ist nahezu identisch mit der Fluoreszenz aus dem Photoprodukt P501 (unten, breite Linie). Zur besseren Orientierung sind die entsprechenden Anregungsspektren gestrichelt eingezeichnet.

Neueste Messungen unter Bestrahlung mit UV-Licht bei 92 K zeigen auch ein Photoprodukt bei ~ 500 nm [Thor2002]. Das dort beobachtete Photoprodukt ist identisch mit dem hier beobachteten P501. Da die Untersuchungen von Thor et al. [Thor2002] bei 92 K durchgeführt wurden, ist ein Auftreten des P510 unwahrscheinlich, da dieses, wie in Kapitel 5.2.4 gezeigt wird, schon bei etwa 50 K wieder zerfällt. Sehr interessant ist die Röntgenstruktur, die von Thor et al. von dem Photoprodukt bei 500 nm erhalten wurde. Demnach wurde durch die UV-Bestrahlung die Aminosäure Glu222 decarboxyliert. Durch das Fehlen dieser Säuregruppe kann aber der Chromophor nicht mehr protoniert werden. Es entsteht folglich die deprotonierte Form des A-Zustandes; die I-Form (siehe Abbildung 229). Dagegen gibt es für das P510 keine strukturelle Interpretation.

5.3.2.2 Bestrahlung des B Chromophors

Ein weiteres Photoprodukt bildet sich bei intensiver Bestrahlung der türkisen Absorptionsbande (B). Dieses Photoprodukt besitzt ein Absorptionsmaximum bei etwa 489 nm (P489) (siehe Abbildung 237).

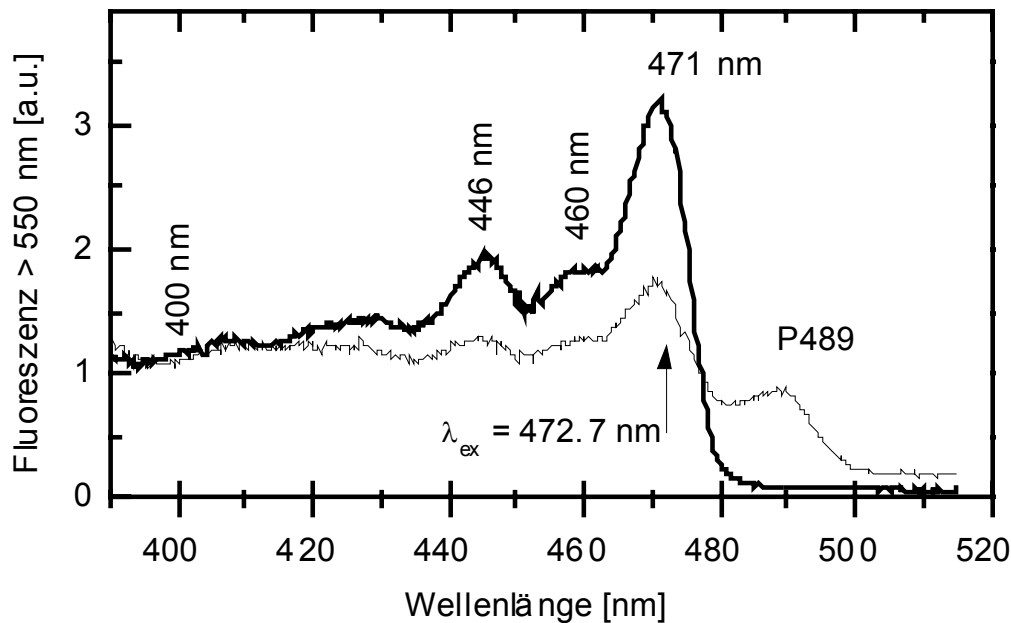


Abbildung 237: Fluoreszenzanregungsspektren vor (dünn) und nach (breit) intensiver Bestrahlung des B-Chromophors bei 472,7 nm (100 mW/cm^2 , 60 min). Es bilden sich ein Photoprodukt bei 489 nm.

Da bei einer Bestrahlung mit 472,7 nm nur der B-Chromophor bestrahlt wird, bleibt der A-Chromophor bei 400 nm erhalten. Bei 477,5 nm wird der isosbestische Punkt gefunden, bei dem keine Signaländerung auftritt, da sich hier die Abnahme des B Zustandes und die Zunahme des P489 die Waage halten. Es gibt keine strukturelle Interpretation dieses Zustandes.

5.3.2.3 Temperaturstabilität der Photoprodukte

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der Photoprodukte werden Temperatur-Ableitungs-Kurven aufgezeichnet (siehe Kapitel 5.2.4). Im Experiment wird das Photoprodukt mit dem Anregungs- oder Fluoreszenzaufbau selektiert und unter langsamen Erwärmen (etwa $1/7 \text{ K/s}$) der Probe detektiert. Zur Unterdrückung von Lumineszenz der mit UV-Licht bestrahlten Vitro-Dynamics Küvetten wird bei Bedarf die Anregungslichtquelle mit einem Chopper moduliert. Danach kann das störende Lumineszenzsignal von detektierten Signal subtrahiert werden.

Abbildung 238 a zeigt die temperaturabhängigen Fluoreszenzsignale der drei Photoprodukte von wt-GFP.

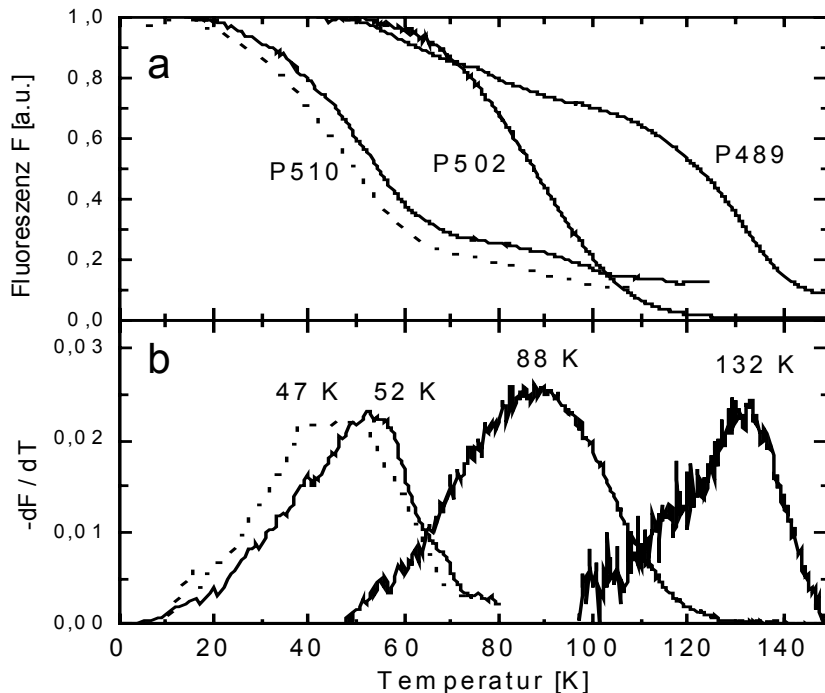


Abbildung 238: Temperatur-Ableitungs-Spektren der drei metastabilen wt-GFP Photoprodukte (oben). Die durchgezogenen Kurven wurden mit einer Aufheizrate von $1/7$ K/s aufgezeichnet. Die gepunktete Linie wurde mit einer ~ 40 fach langsameren Aufheizrate gemessen. Die unteren Kurven sind die entsprechenden negativen Ableitungen. Diese Ableitungen entsprechen den Barrierenverteilungen der thermisch aktivierten Zerfallsprozesse (siehe Kapitel 5.2.4).

Unter den Signalkurven sind die negativen Ableitungen nach der Temperatur angegeben, die nach Gleichung (98) der Barrierenverteilung $f(H)$ der thermisch aktivierten Zerfallsprozesse entsprechen. Für die verschiedenen Zustände kann nach Gleichung (97) die mittlere Barrierenhöhe H_T berechnet werden. Für P510, P502 und P489 ergeben sich mittlere Aktivierungsbarrieren von 14, 23 und 35 kJ/mol.

Wie in Kapitel 5.2.4 erwähnt, sind die Werte für die Aktivierungsbarrieren relativ unempfindlich auf Variationen von K_0 und τ . Jedoch kann bei einer starken Änderung von τ eine geringfügig verschiedene Aufheizkurve erwartet werden. Bei einer Aufheizrate von $1/300$ K/s (gepunktete Kurve in Abbildung 238) verschiebt sich die Fluoreszenzabnahme zu niedrigeren Temperaturen. Berechnet man die Temperaturverschiebung aufgrund der nun langsameren Aufheizrate nach Gleichung (96), ergibt sich für das Photoprodukt P510 eine Temperaturerniedrigung von 52 K auf 47 K. Exakt diese Temperaturerniedrigung wird auch im Experiment beobachtet, was die für Formel (97) gemachten Annahmen von K_0 und τ unterstützt.

5.3.3 Kurzzeitmessungen an Wildtyp-GFP

Kurzzeituntersuchungen im Zeitbereich von Nanosekunden erlauben es die Vorgänge während des Fluoreszenzvorganges zu untersuchen. Dazu wird das TCSPC-Meßsystem (siehe Kapitel 2.6.2.4) mit dem Tieftemperaufbau kombiniert. Angeregt wird die Probe mit 420 nm aus einem Frequenzverdoppelten Titan-Saphir-Laser [Rau1999].

Abbildung 239 zeigt den Fluoreszenzverlauf bei Anregung des A Zustandes mit 420 nm und Detektion des I* Zustandes mit 503 nm. Eine biexponentielle Anpassung der Zerfallskurve mit Entfaltung der Instrumentenfunktion (IRF) zeigt eine ansteigende Komponente mit 441 ps (Programm Fluofit, Picoquant).

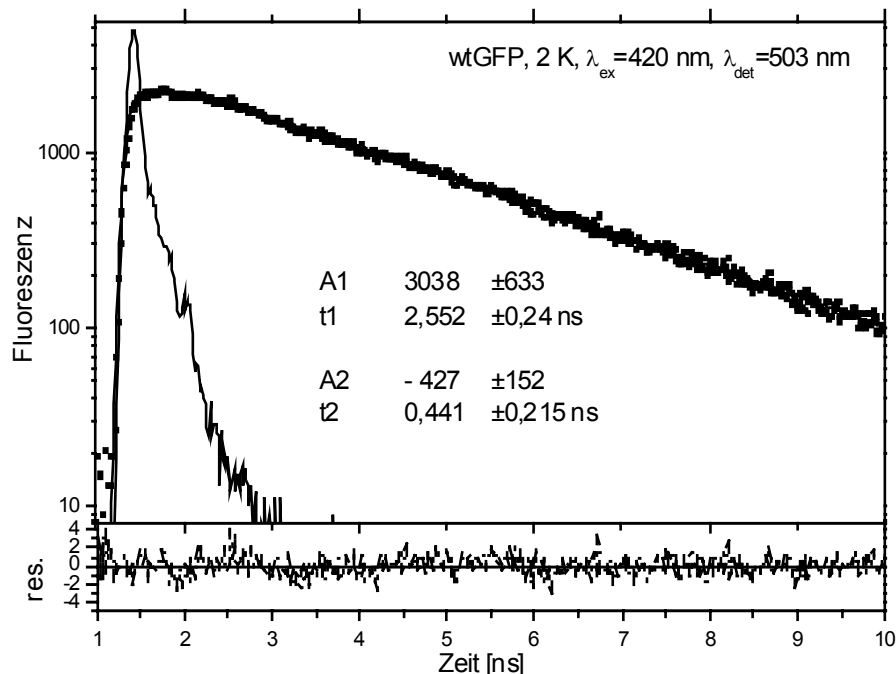


Abbildung 239: Fluoreszenzzerfallskurve von wt-GFP bei 2 K. Gezeigt ist der Fluoreszenzverlauf nach Anregung des A-Chromophors mit 420 nm und Detektion der I* Fluoreszenz bei 503 nm (siehe Abbildung 236).

Der Verlauf kann gut mit zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden. Die ansteigende Komponente mit einer Anstiegszeit von ~441 ps kann der Kinetik des ESPT zugeschrieben werden. Dies ist jedoch viel schneller, als nach einem thermisch aktivierten Prozeß erwartet wird.

Die folgende Tabelle zeigt die Parameter der biexponentiellen Anpassung der A* und I* Fluoreszenz:

Temperatur	det. Wellenlänge	A1 [%]	t1 [ns]	A2 [%]	t2 [ns]
260 K	445 nm A*	2±0,2	1,51±0,1	98±51	0,026±0,011
190 K	445 nm A*	4±0,6	1,38±0,16	96±18	0,073±0,013
70 K	445 nm A*	20±3	1,455±0,02	80±14	0,174±0,038
2 K	445 nm A*	26±3	1,625±0,1	74±10	0,23±0,05
260 K	503 nm I*	73±1	2,62±0,05	27±15	0,12±0,07
190 K	503 nm I*	86±1	2,521±0,05	14±13	0,17±0,08
70 K	503 nm I*	107±5	2,59±0,5	-8±5	0,52±0,34
2 K	503 nm I*	116±24	2,55±0,24	-16±6	0,44±0,22

Da die IRF hier eine Halbwertsbreite von 0,15 ns hatte, sind alle kürzeren Zeiten nur sehr ungenau bestimmbar. Dies macht sich besonders bei den ansteigenden Komponenten der I* Fluoreszenz bemerkbar. So ist z.B. bei Raumtemperatur in der I* Fluoreszenz eine ansteigende Komponente mit ~0,006 ns gemessen worden

[Lossau1996] [Tsien1998] [Chattoraj1996]. Eine ansteigende Komponente kann aber in der I* Fluoreszenz nur bei 2 K und 70 K aufgelöst werden.

Bei den langen Zeiten der A* und I* Fluoreszenz wird keine Temperaturabhängigkeit beobachtet. Für I* wird immer eine Fluoreszenzlebensdauer von ~2,6 ns, für A* ~ 1,5 ns beobachtet. Dies bedeutet, daß die Verlustkanäle, die auch die Fluoreszenzquantenausbeute bestimmen, keine Aktivierungsbarriere besitzen.

Zusammen mit Literaturwerten kann jedoch die Aktivierungsenergie des ESPT bestimmt werden. Abbildung 240 zeigt den temperaturabhängigen Arrheniusplot für die ESPT - Raten.

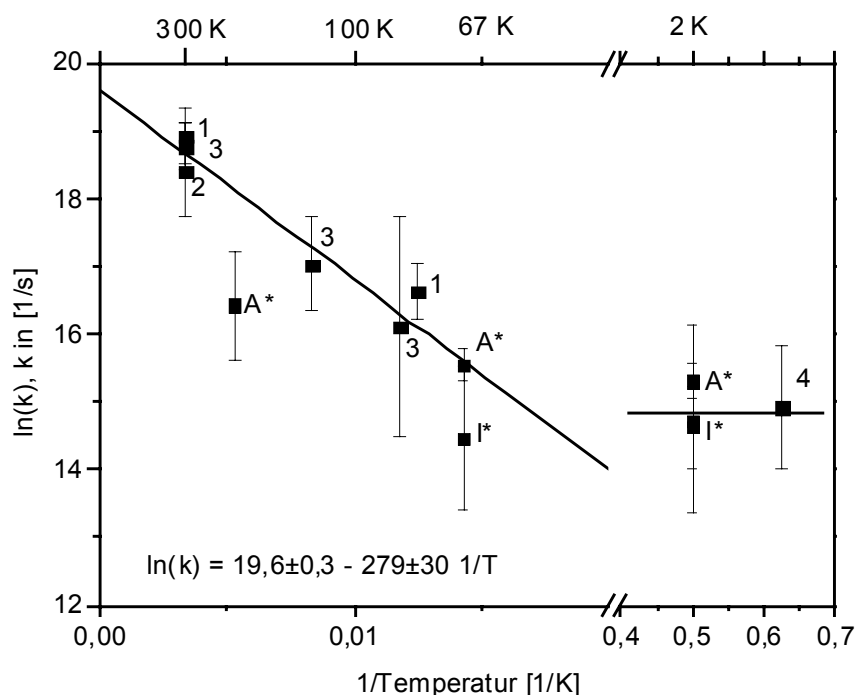


Abbildung 240: Arrheniusplot für die ESPT - Raten. Die Nummern geben Literaturwerte an: 1 [Lossau1996], 2 [Tsien1998], 3 [Chattoraj1996], 4 [Creemers1999]. Punkte mit A* wurden aus den schnellen Zerfallszeiten der A*-Fluoreszenz gewonnen. Punkte mit I* sind ansteigende Komponenten in der I* Fluoreszenz. Zwei Punkte (bei 1,6 K und 2 K) wurden auch aufgrund der relativen Intensitäten der A* und I* Fluoreszenz aus den Fluoreszenzspektren gewonnen.

Die Fitgerade in Abbildung 240 (links) wurde unter Ausschluß der 1,6 K und 2 K Daten mit einer Gewichtung nach den Fehlerbalken ermittelt. Bei 2 K hätte diese Gerade einen Wert von $\ln(k) = 5,6$. Die ESPT-Raten über 60 K können sehr gut nach Gleichung (95) mit einem thermisch aktivierten Prozeß mit $E_A = 2,32 \pm 0,25 \text{ kJ/mol}$ und einem präexponentiellen Faktor von $K_0 = 3 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ beschrieben werden. Die Tieftemperaturdaten bei 2 K passen aber keinesfalls in dieses Modell. Vermutlich dominiert unterhalb von etwa 50 K ein temperaturunabhängiger Tunnelprozeß mit $k \sim 3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ (horizontale Gerade in Abbildung 240 rechts).

5.3.4 Potentialschema für Wildtyp-GFP

Im Vergleich zur Raumtemperatur zeigen die Spektren bei tiefen Temperaturen deutlich mehr Struktur. Dadurch können verschiedene Sub-Zustände in den

Varianten identifiziert werden. Bei fast allen Varianten können durch intensive Bestrahlung langwellig absorbierende Photoprodukte erzeugt werden die erst bei etwa 50 bis 100 K wieder zerfallen. Aufgrund der Tieftemperaturuntersuchungen kann das Potentialschema (siehe Abbildung 229) um metastabile Photoprodukte erweitert werden. Für Wildtyp-GFP zeigt Abbildung 241 dieses modifizierte Potentialschema.

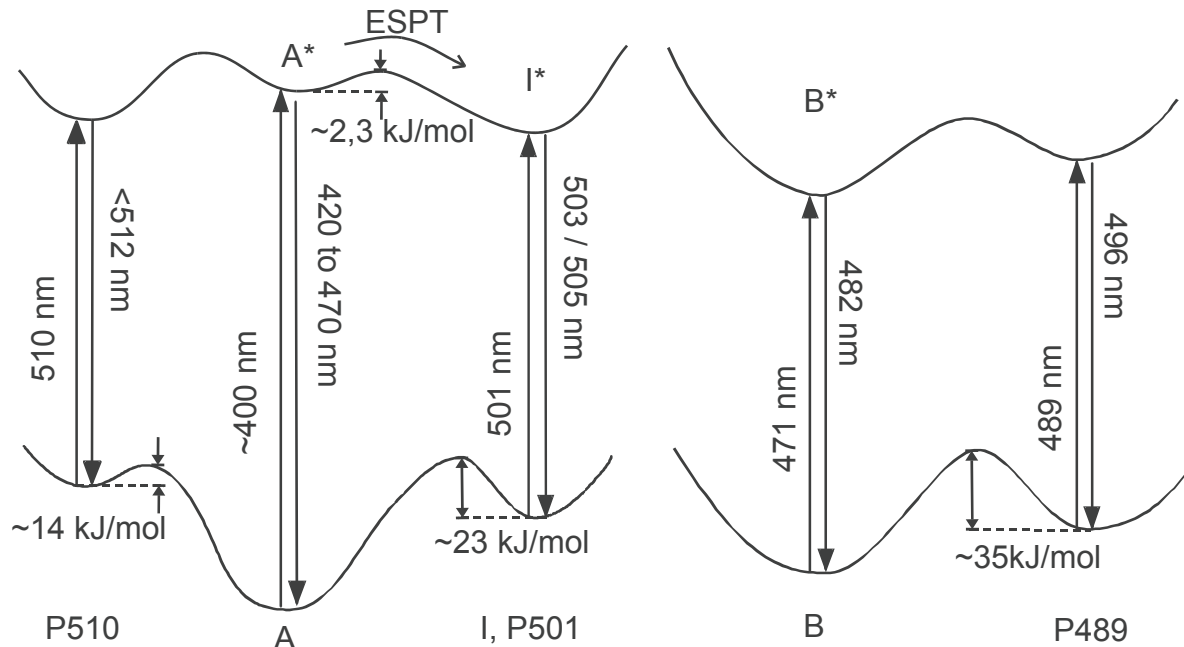


Abbildung 241: Erweitertes Potentialschema für wt-GFP [Seebacher1999].

Aufgrund der sehr ähnlichen Fluoreszenz des Photoprodukts P501 und dem ESPT Akzeptor I* wird hier vermutet, daß es sich um denselben Zustand handelt. Für die Photoprodukte P489 und P510 sind dagegen keine strukturellen Modelle vorhanden. Die angegebenen Energien der Barrieren der Grundzustände werden aus den Aufheizexperimenten gewonnen. Die Barriere für den ESPT wird nach einem Arrhenius Modell aus temperaturabhängigen Kurzzeitmessungen ermittelt.

5.3.5 Stabilisierung von Grundzuständen durch Mutationen

Im Gegensatz zu der im vorigen Kapitel beschriebenen Stabilisierung von Sub-Zuständen durch Temperaturniedrigung, kann diese Stabilisierung auch auf biochemischem Weg erfolgen. Durch eine Reihe von genetischen Mutationen des Proteins soll versucht werden Struktur-Eigenschafts-Beziehungen des GFP zu bestimmen. Besonders gute Punkte für Änderungen sind die Aminosäuren Thr203 und Glu222 die entscheidend an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind (siehe Abbildung 229). Werden diese Aminosäuren durch die etwa gleich großen, aber chemisch sehr verschiedenen Aminosäuren Val und Gln ersetzt, entstehen die zwei Varianten Thr203Val und Glu222Gln. Aufgrund der Strukturmodelle in Abbildung 229 können nun folgende Arbeitshypothesen erstellt werden:

Bei der Variante Thr203Val fehlt die Wasserstoffbrückenbindung, die den deprotonierten B-Chromophor stabilisiert. Jedoch kann über die, immer noch vorhandene Carbonylgruppe der Aminosäure 203 im 'Backbone', der deprotonierte I-Zustand stabilisiert werden.

Bei der Variante Glu222Gln wird durch den Austausch einer Carbonsäuregruppe durch die weniger saure Säureamidgruppe, die Säurestärke der Aminosäure 222 stark herabgesetzt. Dadurch kann die A-Form nicht mehr protoniert werden.

Eine Kombination beider Mutationen destabilisiert sowohl den A- als auch den B-Zustand, wodurch in der Mutante Thr203Val/Glu222Gln nur der Zwischenzustand (I) übrig bleibt.

Dieses Verhalten kann schon an den Raumtemperaturspektren beobachtet werden, wenn durch ein Anpassen von Prototyp-Spektren der A-, B- und I-Form, die Form der Spektren analysiert wird [Wiehler2002]. Die entsprechenden Tieftemperaturuntersuchungen bieten jedoch aufgrund der schmäleren Spektren eine wesentlich deutlichere Zuordnungsmöglichkeit. Abbildung 242 zeigt die Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzspektren von wt-GFP und den 3 Varianten.

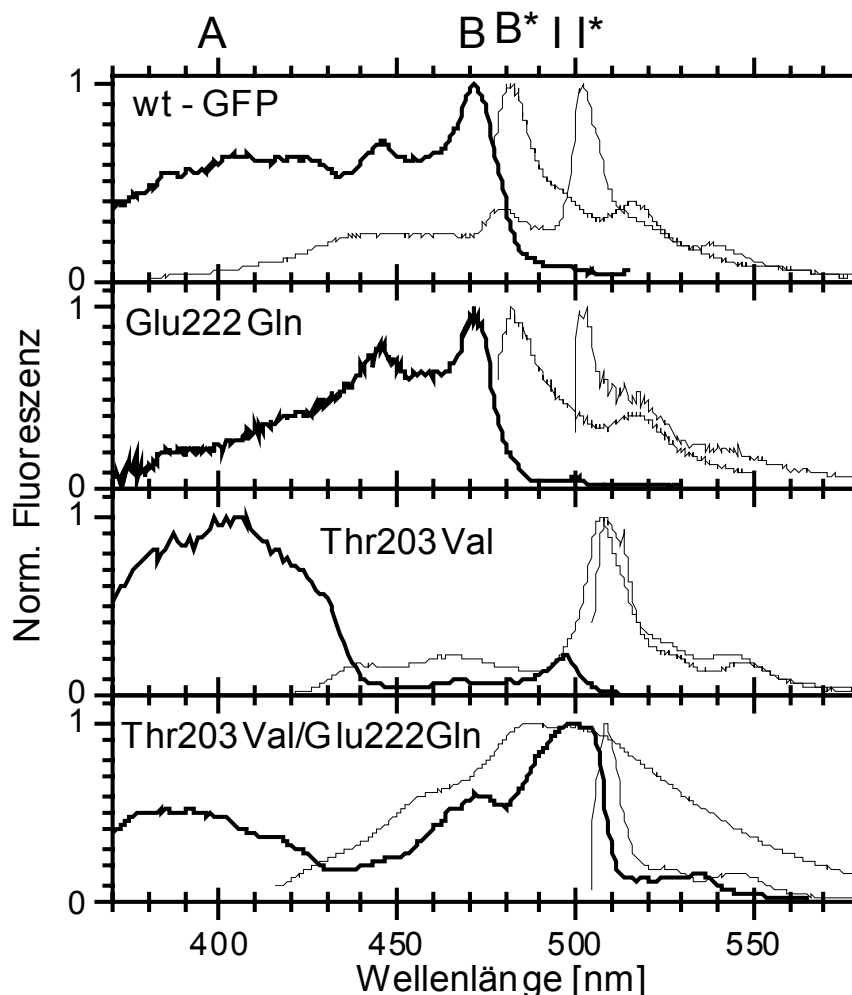


Abbildung 242: Fluoreszenzanregungsspektren (breit) und Fluoreszenzspektren (dünn) von wt-GFP und drei Varianten. An der oberen Achse sind die spektralen Positionen der verschiedenen Formen angegeben. Die Anregungswellenlängen für die Fluoreszenzspektren sind 364 nm und 473 nm (wt-GFP), 473 nm und 496 nm (Glu222Gln), 407 nm und 498 nm (Thr203Val) und 407 nm und 502 nm (Glu222Gln/Thr203Val). Das breite Fluoreszenzspektrum bei der Anregung von restlicher A-Form der Glu222Gln/Thr203Val Variante stammt vermutlich von einem unterdrückten ESPT.

Folgende Wellenlängen werden für die drei verschiedenen GFP-Zustände gemessen:

Chromophor-Zustand	Absorption	Fluoreszenz
A	~400 nm	505 nm (I*)
B	471 nm	482 nm
I	~500 nm	~505 nm

Damit können die vorherrschenden Zustände in den verschiedenen Varianten bestimmt werden. Bei wt-GFP sind überwiegend nur die A- und die B-Form vorhanden. In der Variante Glu222Gln ist, wie zuvor vermutet, die A-Form nicht mehr vorhanden. In der Variante Thr203Val ist, ebenfalls wie vermutet, die B-Form nicht mehr detektierbar. In der kombinierten Variante Thr203Val/Glu222Gln ist, neben einem schwachen Rest der A-Form, überwiegend die I-Form vorhanden. Dies bestätigt die oben aufgeführten Struktur-Eigenschafts-Beziehungen des GFP-Chromophors.

5.4 Überblick

Es wurden noch eine Reihe von Varianten bei tiefen Temperaturen untersucht. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der verschiedenen GFP-Varianten. Die Spalte HB führt die Wellenlängen auf, bei der spektrales Lochbrennen [Völker1989] detektiert wurde. Ein 'x' in der Spalte FLN zeigt, daß hier auch hochaufgelöste Fluoreszenzlinienverschmälerung (fluorescence line narrowing) [Vanderkooi1997] detektiert wird.

Variante	Grundzustände				Photoprodukte			
	Mutation	Abs. [nm]	Fl. [nm]	HB [nm] FLN	Abs. [nm]	Fl. [nm]	FLN	Stabilität
Thr203Val	400	510			506+512	508+513	xx	?,90K
	497	505						
wt	472	482	482,5		489	496		130K
	400	503			501+510	505+511		88K+50K
Thr203Tyr	410	510+445+475			514,5	516	x	120K
	512	schwach		x				
Thr203Val Glu222Gln	496	500						
	503	508			535,5	538		100K
	400 (nur TT)	~490						
Glu222Gln	471	484			514	521		100K
	500	503		x				
Thr203Tyr Glu222Gln	512	522						
	503	512						
	410 (mehr TT)	440+492				538?		
Ser65Gly	487							
	420 (3K)							
Thr203Tyr Ser65Gly	514,5	519	514,5	x				
	480	505						

	455	490,510						
Thr203Val	497	503						
Glu222Gln Ser65Gly	400							
Glu222Gln Ser65Gly	476	485,5						
	400	485						
Thr203Tyr	508	514	514,5		540			
Glu222Gln	470	500						
Ser65Gly	420	460,500,514						
Tyr66Trp	464	468+500		x	497,5	500	x	93K
DsRed	553,6		568,2		590			ca. 20K
Ser65Thr	490	499			528	531		85K
Phe64Leu (EGFP)	470?	485		x				
	505	506						
	400?	440..500						
wt- Chromophor pH9	420	475						
wt- Chromophor pH2	402							

6 Zusammenfassung

Die Anwendung der Einzelmolekülspektroskopie auf poröse Festkörper wird erstmals in dieser Arbeit beschrieben. Um diese relativ neue Methode auf die Untersuchung von Farbstoffen in porösen Festkörpern anzuwenden, wurde ein konfokales Mikroskop so umgebaut, daß es zur Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle einsatzfähig ist. Dafür wurden verschiedene optische Detektionssysteme aufgebaut, um alle im Fluoreszenzlicht enthaltenen Informationen zu erhalten. Mit einer Avalanche Photodiode wurde die Empfindlichkeit des Mikroskops auf die Detektion einzelner Lichtquanten gesteigert. Mit einem gepulsten Laser wurde der Zeitbereich der Detektion bis hinab in den Nanosekundenbereich erweitert. Durch den Einbau einer Lambda-Halbe Platte wurde die Polarisierung des Laserlichtes beeinflusst, um die Orientierung eines einzelnen Moleküls zu bestimmen. Schließlich wurde durch den Einsatz eines Prismas und einer empfindlichen CCD-Kamera die spektrale Aufspaltung ermöglicht, um damit die Fluoreszenzspektren zu bestimmen.

Mit allen Experimenten war es nicht nur möglich statische Eigenschaften der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe zu bestimmen, sondern auch deren dynamische Veränderungen.

Eine der wichtigsten Anforderungen an organische Farbstoffmoleküle für Einzelmolekülspektroskopie ist die Photostabilität. Um geeignete Farbstoff für den Einbau in die Porenstrukturen zu erhalten, wurden die Photostabilitäten verschiedener Farbstoffe untersucht. Dazu wurden von einigen ausgewählten Farbstoffen die detektierbaren Fluoreszenzphotonen gezählt. Es stellte sich heraus, daß das Farbstoffmolekül TDI in einer dünnern PMMA Schicht eine außergewöhnlich hohe Photostabilität besitzt. Einige TDI-Molekülen emittieren sogar 10^{11} Fluoreszenzphotonen bis zum irreversiblen Photobleichen. Zum anderen wurde für sehr instabile Farbstoffmoleküle eine Methode entwickelt, um durch Bleichexperimente an einem Ensemble von Molekülen mit dem konfokalen Mikroskop die Anzahl der emittierten Fluoreszenzphotonen zu ermitteln. Für den Einbau in poröse Festkörper wurden daraufhin einige Oxazinfarbstoffe und das in biologischen Untersuchungen häufig verwendete Cy5 ausgewählt. Diese Farbstoffe können im roten Spektralbereich angeregt werden und besitzen mit etwa 10^7 emittierten Fluoreszenzphotonen eine relativ gute Photostabilität.

Als Porenstruktur wurden besonders zwei Materialien untersucht. Die Porenstruktur AFI, die im Material $\text{AlPO}_4\text{-5}$ vorkommt, besitzt eindimensionale Kanäle, die hexagonal wie in einer Bienenwabe angeordnet sind. Von diesem Material können auch regelmäßige Kristalle hergestellt werden, die bis zu einem Millimeter lang sind. Leider sind die Poren des $\text{AlPO}_4\text{-5}$ mit 0,73 nm Innendurchmesser sehr eng. Alle geeigneten Fluoreszenzfarbstoffe sind etwas größer und werden daher in mehr oder weniger großen Deformationen in dem Kristall eingelagert. Größere Poren besitzen die mesoporösen M41S Materialien. In diese passen alle Farbstoffe ohne Deformation hinein. Jedoch ist die Kristallgröße der M41S Materialien auf wenige μm beschränkt. Mit der Methode der homogenen Fällung können die bisher größten hexagonal geordneten MCM-41 Kristalle hergestellt werden. Zentimeter große hexagonale M41S Festkörper (Monolithe), die durch eine Synthese mit einem Flüssigkristall hergestellt werden, verlieren, wie hier gezeigt wird, während der Synthese ihre eindimensionale Ausrichtung der Poren.

Obwohl die Einzelmolekülspektroskopie im Vordergrund der Arbeit steht, sind auch einige interessante Beobachtungen an porösen Materialien mit vielen Farbstoffmolekülen (Ensemblemessungen) durchgeführt worden. Aufgrund des hohen dreidimensionalen Auflösungsvermögens des konfokalen Mikroskopes war es möglich, auch an nur wenige Mikrometer großen Kristallen orts aufgelöste Untersuchungen durchzuführen. Bisher war es oft nicht möglich, zwischen Oberflächeneffekten und Eigenschaften, die in der Porenstruktur hervorgerufen werden, zu unterscheiden.

Untersuchungen mit vielen Farbstoffmolekülen (Ensemblemessungen) zeigten, daß auch scheinbar perfekte Kristalle im Inneren oft unregelmäßig aufgebaut sind. So wurde eine Methode entwickelt, um Defektstrukturen in Kristallen mit Fluoreszenzfarbstoff anzufärben und dreidimensional mit dem konfokalen Mikroskop darzustellen. Große kalzinierte MFI Kristalle besitzen Defektstrukturen, die sich im Inneren entlang der langen Kristallachse ausbreiten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß scheinbar homogen mit Farbstoff beladene Kristalle oft eine sehr ungleichmäßige Farbstoffverteilung besitzen. Auch Kristalle, die schon während der Synthese mit Farbstoff beladen werden, sind oft nicht gleichmäßig beladen. Dreidimensionale Fluoreszenzbilder von großen und regelmäßig aufgebauten $\text{AlPO}_4\text{-5}$ Kristallen, die mit dem Farbstoff DCM beladen wurden, zeigten verschiedene geordnete und ungeordnete Strukturen.

Durch die Analyse der Polarisation kann die Orientierung der Farbstoffmoleküle untersucht werden. Untersuchungen an verschiedenen großen Oxazin Farbstoffen, die während der Synthese in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ eingebaut wurden, zeigten, daß die Ausrichtung entlang der Porenrichtung mit steigender Molekülgröße abnimmt. Das kleine Oxazin 1 ist noch relativ gut orientiert, während das große Oxazin 750 ohne Vorzugsrichtung eingebaut wird.

In verschiedenen M41S Materialien wurde die Diffusion von Farbstoff untersucht. Fluoreszenzbilder von M41S Monolithen zeigten das Eindiffundieren verschiedener Farbstoffe in den Festkörper. Über die zeitabhängige Analyse der Eindringtiefe konnten dadurch die Diffusionskonstanten ermittelt werden. Es zeigte sich, daß die Diffusion jeweils bei geladenen Molekülen, größeren Molekülen und bei kalziniertem Monolithen verlangsamt wird.

Die Untersuchung des Diffusionsverhaltens in einer M41S Nadel zeigte eine etwa doppelt so schnelle Diffusion quer zur Nadel. Dies steht in Übereinstimmung zu elektronenmikroskopischen Bildern, die zeigen, daß die Nadeln aus zirkularen Poren besteht, die quer zur Nadelrichtung orientiert sind.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden erstmals einzelne Farbstoffmoleküle innerhalb von porösen Festkörpern detektiert. Im Vergleich zu Referenzproben, bei denen der Farbstoff in einer dünnen Polymerschicht eingebettet wird, ist das Signal zu Untergrund Verhältnis der Einzelmoleküluntersuchungen in den porösen Festkörpern etwas geringer. Auch an der Photostabilität der Fluoreszenzfarbstoffe konnte durch die Einlagerung in die Porenstrukturen keine Verbesserung beobachtet werden.

Die Moleküle können nicht nur detektiert, sondern auch spektroskopiert werden. Dabei konnten durch die Analyse der Fluoreszenz verschiedene Parameter bestimmt werden, wie folgende Tabelle zeigt:

Beobachtete Eigenschaft des Lichtes	Information aus statischen Bestimmungen	Information aus zeitabhängigen Bestimmungen
Intensität	immer Notwendig	Raten (Singulett, Triplett, etc.)
Ort	Position	Diffusion, Transport
Polarisation	Orientierung	Drehung, Rotation
Energie	Fluoreszenzspektren	spektrale Diffusion

Diese verschiedenen Untersuchungsmöglichkeiten wurden aufgebaut und an einer Referenzprobe (TDI in PMMA) getestet. Für die Datenanalyse konnte zum Teil auf Methoden in der Literatur zurückgegriffen werden. Es wurde darauf geachtet, daß immer eine Fehlerabschätzung oder eine Simulation durchgeführt wurde, damit die Ergebnisse sinnvoll interpretiert werden konnten.

Oft konnten schon an der Referenzprobe (TDI in PMMA) sehr interessante Ergebnisse erhalten werden. So wurden z.B. neben der extrem hohen Photostabilität zwei verschiedene Populationen der Triplettlebensdauer gemessen. Die Position eines einzelnen TDI Moleküls konnte durch die Detektion vieler Photonen auf besser als 1 nm bestimmt werden. Die Analyse von zeitabhängigen Orientierungswinkeln deutet darauf hin, daß ein TDI Molekül in PMMA noch eine sehr geringe Wackelbewegung ($\sim 1^\circ$) ausführen kann. Bei der Analyse mehrerer 10000 Fluoreszenzspektren von einem TDI Molekül konnten spontane Änderungen der Fluoreszenzwellenlänge und der Schwingungskopplung beobachtet werden.

Obwohl die Messungen in den Porenstrukturen aufgrund der geringeren Photostabilität nicht so präzise Ergebnisse liefern, konnten auch hier interessante Beobachtungen gemacht werden.

Durch die Analyse der Orientierungswinkel vieler individueller Farbstoffmoleküle konnte gezeigt werden, daß die einzelnen Oxazinfarbstoffe in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ eine gaußförmige Verteilungsfunktion bezüglich ihres Tiltwinkels zur Porenrichtung aufweisen. Die zuvor erwähnten Messungen an einem Ensemble von Molekülen können die Form der Verteilungsfunktion nicht bestimmen. Aufgrund der Kenntnis einer gaußförmigen Verteilungsfunktion kann auf ein statistisches Einbauverhalten der Farbstoffmoleküle in Defektstrukturen während der Synthese geschlossen werden. Auch in einem MCM-41 Kristall, dessen große Poren jeden beliebigen Einbauwinkel des Farbstoffes Cy5 erlauben würden, wird eine bevorzugte Orientierung beobachtet. Der Orientierungswinkel zur Porenrichtung zeigt auch hier eine gaußförmige Verteilungsfunktion. Interessanterweise wird bei der frontalen Ansicht auf die hexagonale Struktur (entlang der Bienenwabenstruktur) eine bevorzugte Orientierung auf die Flächen des Sechsecks beobachtet. Eine Ensemblemessung kann unmöglich diese bevorzugte Orientierung detektieren.

Neben diesem statischen Verhalten zeigen einige wenige Moleküle auch eine Änderung der Molekülorientierung. Zwei individuelle Oxazin 1 Moleküle änderten ihre Orientierung in $\text{AlPO}_4\text{-5}$ während der Messung spontan. Im Vergleich zu den anderen Oxazin 1 Molekülen besaßen diese beiden einen ungewöhnlich großen Orientierungswinkel gegen die Porenrichtung. Vermutlich wird die Bewegung durch einen größeren Defekt der Porenstruktur ermöglicht. Ein TDI Molekül im Inneren eines M41S Monolithen zeigte sogar eine mehrfache Drehung zwischen 3 verschiedenen Orientierungen.

Eine Dynamik bezüglich des Ortes zeigten einzelne TDI Moleküle im M41S Monolith. Aufgrund der starken hydrophoben Eigenschaften des TDI kann davon ausgegangen werden, daß sich der Farbstoff immer noch im Inneren der Mizelle des Flüssigkristalls befindet, aus dem der Festkörper synthetisiert wurde. Die Diffusionsbewegung kann durch eine Serie von Fluoreszenzbildern mit dem konfokalen Mikroskop direkt verfolgt werden. Entgegen der erwarteten eindimensionalen Diffusion, die die hexagonale Struktur des Monolithen eigentlich erwarten läßt, wird eine isotrope Diffusion ohne Vorzugsrichtung beobachtet ($D \sim 0,04 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Im reinen Flüssigkristall dagegen ist die eindimensionale Diffusion vorhanden. Vermutlich werden die eindimensionalen Poren bei der Synthese der festen Silikatwand so stark verknäult, daß auf der beobachteten Längenskala ein Festkörper ohne Vorzugsrichtung entsteht. Auch die viel langsamere Diffusion im Vergleich zum reinen Flüssigkristall ($D \sim 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$) kann über diese Verknäulung der Poren erklärt werden.

Schließlich wurden noch Messungen durchgeführt, um simultane Änderungen der Orientierung, Fluoreszenzspektren oder Tripletraten an einem einzelnen Farbstoffmolekül zu beobachten. Besonders die gleichzeitige Detektion von Fluoreszenzspektren und der Orientierung lassen sich experimentell gut durchführen. Zur Interpretation der Ergebnisse muß hier zwischen einer starken und einer schwachen Kopplung zwischen Gast und Wirt unterschieden werden. Bei einer polaren Probe wird eine starke Wechselwirkung zwischen Gast und Wirt erwartet. Diese müßte dazu führen, daß sich Änderungen in der Orientierung auch in geänderten Fluoreszenzspektren und umgekehrt bemerkbar machen. Bei einem geladenen Molekül wie Oxazin 1 wird solch eine starke Kopplung des elektronischen Systems an die polare AlPO_4 -5 Umgebung erwartet. Eine starke Änderung des Fluoreszenzspektrums könnte daher von einer Umorientierung des Farbstoffes herrühren. Bei den durchgeführten gleichzeitigen Messungen konnte aber nur spektrale Diffusion (± 1 -20 nm), aber keine gleichzeitige signifikante Umorientierung ($> 3^\circ$) beobachtet werden. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte die Bewegung des Gegenions des Farbstoffmoleküls sein, dessen Lage einen großen Einfluß auf die Fluoreszenzeigenschaften hat. Eine Umorientierung mit gleichzeitiger Detektion der Fluoreszenzspektren konnte jedoch nicht gemessen werden.

Beide Ereignisse, Umorientierungen und spektrale Änderungen, konnten an TDI im M41S Monolith detektiert werden. Dabei zeigte sich aber, daß es sich hier um zwei unabhängige Prozesse handelt. Deutliche spektrale Sprünge (> 3 nm) korrelieren nicht mit deutlichen Umorientierungen ($\sim 60^\circ$). Eine geometrische Änderung des Farbstoffmoleküls oder der näheren Umgebung scheidet daher als Ursache für die spektrale Diffusion aus. Da hier aber eine schwache Wechselwirkung zwischen dem unpolaren TDI und der unpolaren Tensidumgebung vorliegt, werden auch keine starke Änderungen der Fluoreszenzspektren während der Umorientierung erwartet. Die spektrale Diffusion wird hier vermutlich von kleinen diffundierenden Teilchen (z.B. O_2 oder Ionen) verursacht, die sich unabhängig von den Farbstoffmolekülen bewegen können.

Die Methode der Einzelmolekülspektroskopie liefert neue Einblicke in poröse Festkörper. Besonders durch die zeitabhängigen Untersuchungen können Informationen erhalten werden, die zuvor unter dem Mittelwert verborgen blieben.

Ein kleiner Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Tieftemperaturfluoreszenzspektroskopie an dem grün fluoreszierendem Protein (GFP). Dafür wurden der

Wildtyp und verschiedene Varianten mit Mutationen in der Umgebung des zentralen Chromophors bei 2 K untersucht. Im Vergleich zur Raumtemperatur zeigten die Spektren bei tiefen Temperaturen deutlich mehr Struktur. Dadurch konnten verschiedene Sub-Zustände in den Varianten identifiziert werden. Bei fast allen Varianten konnten durch intensive Bestrahlung langwellig absorbierende Photoprodukte erzeugt werden, die erst bei etwa 50 bis 100 K wieder zerfallen. Obwohl eine relativ starke Elektron-Phonon-Kopplung beobachtet wird, ist an einigen ausgewählten Stellen auch hochaufgelöste Tieftemperaturspektroskopie wie spektrales Lochbrennen und Fluoreszenzlinienverschmälerung möglich. Durch Temperatur-Ableitungs-Spektroskopie werden an Wildtyp-GFP die Energien und Verteilungsfunktionen der Zerfallsbarrieren der metastabilen Photoprodukte bestimmt. Schließlich wurde durch temperaturabhängige Kurzzeitspektroskopie an Wildtyp-GFP der 'Excited state proton transfer' (ESPT) charakterisiert. Für diesen wird bis etwa 50 K eine thermische Barriere nach Arrhenius mit einer Aktivierungsenergie von $\sim 2,3$ kJ/mol gefunden. Unterhalb von etwa 50 K dominiert vermutlich ein Tunnelprozeß.

7 Literaturverzeichnis

1. [Altmaier] S. Altmaier, AK Behrens, Hannover
2. [Ambrose1999] P. Ambrose, P. Goodwin, J. Nolan, Cytometry 36 (1999) 224.
3. [Atkins1996] P.W. Atkins, Physikalische Chemie, VCH, Weinheim, 2. Auflage, (1996).
4. [Attard1995] G. S. Attard, J. C. Glyde, C. G. Göltner, Nature 378 (1995) 366
5. [Augustin1998] H.W. Augustin, Dissertation Chemie, LMU-München (1998) ISBN 3-933083-36-2.
6. [Balkus1995] K. J. Balkus, M. Eissa, R. Levado, J. Am Chem. Soc. 117 (1995) 10753
7. [Bartko1999] A.P. Bartko, R.M. Dickson, J. Phys. Chem. B 103 (1999) 11237.
8. [Bartussek1995] R. Bartussek, P. Hänggi, Phys. Bl. 51 (1995) 506.
9. [Basche1995] T. Basche, S. Kummer, C. Bräuchle, Nature 373 (1995) 132.
10. [Basche1996] T. Basché, C. Bräuchle, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 100 (1996) 1269.
11. [Baumann2000] R. Baumann, Dissertation 2000, Chemie LMU-München, ISBN 3-89791-128-0
12. [Behrens1996] P. Behrens, G.D. Stucky, Kapitel 25 "Novel Materials Based on Zeolites" in "Comprehensive Supramolecular Chemistry" (Hrsg. J.L. Atwood, D.D. mac Nicol, J.E.D. Davies, F. Vögtle), Band 7 (Hrsg. G. Alberti, T. Bein), Pergamon Press, Oxford 1996, 721.
13. [Berendzen1990] J. Berendzen, D. Braunstein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990) 1.
14. [Berg1993] H. C. Berg, Random walks in biology, Princeton University Press (1993).
15. [Binder1997] G. Binder, L. Scandella, J. Kritzenberger, J. Gobrecht, J. Koegler, R. Prins, J. Phys. Chem. B 101 (1997) 483
16. [Binnig1982] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, Phys. Rev. Lett. 49 (1982) 57.
17. [Binnig1986] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Phys. Rev. Lett. 56 (1986) 930.
18. [Blanford2001] C.F. Blanford, R.C. Schroden, M. Al-Daous, A. Stein, Adv. Matter. 13 (2001) 26.
19. [Blum2001] C. Blum, F. Stracke, S. Becker, K. Müllen, A. J. Meixner, J. Phys. Chem. A 105 (2001) 6983.
20. [Bockstette1998] M. Bockstette, D. Wöhrle, I. Braun, G. Schulz-Ekloff, Micro. Meso. Mat. 23 (1998) 83
21. [Bondi1964] A. Bondi, J. Phys. Chem. 68 (1964) 441.
22. [Borja1993] M. Borja, P.K. Dutta, Nature 362 (1993) 43.
23. [Boroff1986] N. Bobroff, Rev. of Sci. Instr. 57 (1986) 1152
24. [Brackmann1994] U. Brackmann, Lambdachrome laser dyes, 2nd. ed., Lambda Physik, Göttingen, (1994)
25. [Braun1997] I. Braun, G. Schulz-Ekloff, M. Bockstette, D. Wöhrle, Zeolites 19 (1997) 128
26. [Braun2000] I. Braun, G. Ihlein, F. Laeri, J.U. Nöckel, G. Schulz-Ekloff, F. Schüth, U. Vietze, O. Weiß, D. Wöhrle, Appl. Phys. B, 70 (2000) 335.
27. [Brejc1997] K. Brejc, T. Sixma, P. Kitts, S. Kain, R. Tsien, M. Ormö, S. Remington, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 2306.
28. [Brown] R. Braun, Uni. Poe, Frankreich
29. [Brown1987] R.G.W. Brown, K.D. Ridley, J.G. Rarity, Appl. Optics 26 (1987) 2383

30. [Brühwiler1998] D. Brühwiler N. Gfeller, G. Calzaferri, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 2923.
31. [Calzaferri1992] G. Calzaferri, N. Gfeller, J. Phys. Chem. 96 (1992) 3428
32. [Cao1998] X. Cao, J. L. McHale, J. Chem. Phys 109 (1998) 1901
33. [Caro1992] J. Caro, G. Finger, J. Kornatowski, Zeolites 12 (1992) 658.
34. [Carslaw1959] H.S. Carslaw, J.C. Jaeger, Conduction of heat in solids, Oxford University Press, 2. Ed (1959).
35. [Chalfie1994]M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, Science 263 (1994) 802.
36. [Charnell1971] J. F. Charnell, J. Crystal Growth 8 (1971) 291
37. [Chattoraj1996] M. Chattoraj, B. King, G. Bublitz, G. Boxer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1996) 8362.
38. [Christ2001] T. Christ, F. Kulzer, P. Bordat, T. Basché, Angew. 113 (2001) 4323.
39. [Cona1996] M.L. Cona, A. Corma, V. Fornés, H. García, M. Miranda, C. Baerlocher, C. Aengauer, J. Am Chem. Soc. 118 (1996) 11006
40. [Corle1996] T.R. Corle, G.S. Kino, Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems, Academic Press, San Diego (1996)
41. [Cox1988] S.D. Cox, T.E. Gier, G.D. Stucky, J. Bierlein, J. Am Chem. Soc 111 (1988) 2986
42. [Cozens1996] F.L. Cozens, M. Régimbald, H. García, J.C. Scaiano, J. Phys. Chem. 100 (1996) 18173.
43. [Creemers1999] T.M.H. Creemers, A.J. Lock, V. Subramaniam, T.M. Jovin, S. Völker, Nature Struct. Bio. 6 (1999) 557.
44. [Creemers2000] T.M.H. Creemers, A.J. Lock, V. Subramaniam, T.M. Jovin, S. Völker, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 2974.
45. [Davis1992] M.E. Davis, R.F. Lobo, Chem. Mater. 4 (1992) 756.
46. [Deeg1992] F.W. Deeg, M. Ehrl, C. Bräuchle, R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, J. Luminescence 53 (1992) 219
47. [Depster1972]D.N. Dempster, T. Morrow, R. Rankin, G.F. Thompson, Faraday Trans. II, 68 (1972) 1479-1496
48. [Dewar1977] M.J.S. Dewar, W. Thiel, J. Am. Chem. Soc. 99 (1977) 4907.
49. [Eggeling1998] Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R., Seidel, C. A. M., Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine, Eds.: Rettig, W., Strehmel, B., Schrader, S.; Springer-Verlag (1998) 193
50. [Eggeling1998b] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C.A.M. Seidel, Anal. Chem. 70 (1998) 2651.
51. [Egner1999] A. Egner, S.W. Hell, J. Microsc. 193 (1999) 244
52. [Ehrl1994] M. Ehrl, F.W. Deeg, C. Bräuchle, O. Franke, A. Sobbi, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, J. Phys. chem. 98 (1994) 47
53. [Elson1974] E.L. Elson, D. Madge, Biopolymers 13 (1974) 1
54. [English2000] D. S. English, E. J. Harbron, P. F. Barbara, JPCA 104 (2000) 9057
55. [Erlangen2001] http://www.uni-erlangen.de/docs/FAUWWW/Aktuelles/2001/Nachrichten_2001/Zeolith.html
56. [Firouzi1995] A. Firouzi, D. Kumar, L.M. Bull, T. Besir, P. Sieger, Q. Huo, S.A. Walker, J.A. Zasadzinski, C. Glinka, J. Nicol, D. Margolese, G.D. Stucky, B.F. Chmelka, Science 267 (1995) 1183
57. [Fleury2000] L. Fleury, J.M. Segura, G. Zumofen, B. Hecht, U.P. Wild, Phys. Rev. Lett. 84 (2000) 1148.

58. [Friedrich1980] J. Friedrich, J.D. Swalen, D. Haarer, J. Chem. Phys. 73 (1980) 705.
59. [Friedrich1995] J. Friedrich, Methods of Enzymology, Academic Press, San Diego, 246 (1995) 226
60. [Fultz2001] B. Fultz, J.M. Howe "Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials" Springer-Verlag (2001).
61. [Funatsu1995] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, Nature 374 (1995) 555.
62. [Ganschow2001] M. Ganschow, G. Schulz-Ekloff, M. Wark, M. Wendschuh-Josties, D. Wöhrle, J. Mater. Chem., 11 (2001), 1823
63. [Gfeller1997] N. Gfeller, G. Calzaferri, JPC B 101 (1997) 1396.
64. [Gfeller1998] N. Gfeller, S. Megelski, G. Calzaferri, JPC B 102 (1998) 2434
65. [Gies1992] H. Gies, B. Marler, Zeolites 12 (1992) 42.
66. [Giessibl1995] F. J. Giessibl, Science 267 (1995) 68.
67. [Girnus1995] I. Girnus, M. Poll, J. Richter-Mendau, M. Schneider, M. Noack, D. Venzke, J. Caro, Adv. Mater. 1995, 7, 711.
68. [Glaue] A. Glaue, AK Behrens, München
69. [Glaue1999] A. Glaue, Dissertation 1999, München, ISBN 3-89722-331-7.
70. [Grinvald1974] A. Grinvald, I.Z. Steinberg, Anal. Biochem. 59 (1974) 583
71. [Gross2000] L.A. Gross, G.S. Baird, R.C. Hoffman, K.K. Baldridge, R.Y. Tsien, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 11990
72. [Guth1986] J.L. Guth, H. Kessler, R. Wey, Stud. Surf. Sci. Catal . 1986 , 28, 121.
73. [Ha1997] T. Ha, T. Enderle, D.S. Chemla, P.R. Selvin, S. Weiss, Chem. Phys. Lett. 271 (1997) 1.
74. [Ha1999] T. Ha, T.A. Laurence, D.S. Chamlra, S. Weiss, J. Phys. Chem. B 103 (1999) 6839
75. [Hamamatsu1994] Datenblatt TPMS1013E03, cat1.hpk.co.jp/Jpn/catalog/ETC/R3896_TPMS1013E03.pdf (1994)
76. [Hecht1987] E. Hecht, Optics, Second Ed., Addison-Westley (1987).
77. [Hecht2000] B. Hecht, B. Sick, U. P. Wild, V. Deckert, R. Zenobi, O. J. F. Martin, D. W. Pohl, J. Chem. Phys, 112 (2000) 7761.
78. [Hell1993] S.W. Hell, G. Rainer, C. Cremer, E.H.K. Stelzer, J. Microsc. 169 (1993) 391
79. [Hellriegel2000] C. Hellriegel, Diplomarbeit 2000, Chemie LMU-München.
80. [Hoffmann1997] K. Hoffmann, F. Marlow, J. Caro, Adv. Mater. 9 (1997) 567.
81. [Holtrup1997] F. Holtrup G. Müller, H. Quante, S. De Freyer, F.C. De Schryver, K. Müllen, Chem. Eur. J. 5 (1999) 2388
82. [Hoppe 1994] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, C. Kirschhock, H. Fuess, Stud. Surf. Sci. Catal. 84 (1994) 821.
83. [Hoppe1993] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, E.S: Shpiro, O.P. Tkachenko, Zeolites 13 (1993) 222
84. [Hoppe1994] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, J. Rathousky, J. Starek, A. Zukal, Zeolites 14 (1994) 126
85. [Huo1994] Q. Huo, D.I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T.E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P.M. Petroff, F. Schüth, G.D. Stucky, Nature 368 (1994) 317
86. [Ihle1998] G. Ihlein, F. Schüth, O. Krauß, V. Vietze, F. Laeri, Adv. Mat. 10 (1998) 1117.
87. [Ikeda1999] T. Ikeda, M. Miyazawa, F. Izumi, Q. Huang, A. Santoro, J. of Physics and Chemistry of Solids 60 (1999) 1531.
88. [Ishii2000] V.Ishii, T. Yanagida, Single Mol. 1 (2000) 5.

89. [Jäger] R. Jäger, AK Behrens, Hannover
90. [Jäger2002] R. Jäger, Dissertation 2002, Chemie Uni-Hannover.
91. [Jung2001] G. Jung, Dissertation 2001, Chemie LMU-München, ISBN 3-89791-231-7
92. [Kasche1964] V. Kasche, L. Lindqvist, J. Phys. Chem. 68 (1964) 817.
93. [Knörr2000] S. Knörr, Bericht zum PC F-Praktikum LMU (2000).
94. [Koberling2001] F. Koberling, A. Mews, T. Basche, Adv. Mater. 13 (2001) 672.
95. [Köhler1987] W. Köhler, J. Friedrich, Phys. Ref. Lett. 59 (1987) 2199.
96. [Kresge1992] C.T. Cresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartili, J.S. Beck, Nature 359 (1992) 710
97. [Krueger1988] J.S. Krueger, J.E. Mayer, T.E. Mallouk, J. Am. Chem. Soc. 110 (1988) 8232.
98. [Kruse1972] N.J. Kruse, G.J. Small, J. Chem. Phys. 56 (1972) 2985.
99. [Kukla1996] V. Kukla, J. Kornatowski, D. Demuth, I. Girnus, H. Pfeifer, L.V.C. Rees, S. Schunk, K.K. Unger, J. Kärger, Science, 272 (1996) 702.
100. [Kulzer1997] F. Kulzer, S. Kummer, R. Matzke, C. Bräuchle, T. Basché, Nature 387 (1997) 688.
101. [Kulzer1999] F. Kulzer, F. Koberling, T. Christ, A. Mews, T. Basché, Chem. Phys. 247 (1999) 23.
102. [Kummer1996] S. Kummer, Dissertation 1996, Chemie LMU-München.
103. [Laeri1998] http://gaston.iap.physik.tu-darmstadt.de/lp/proj_zeo/proj_zeo.html
104. [Lakowicz1999] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2nd ed. (1999), ISBN 0-306-46093-9
105. [Lançon1999] E. Lançon, Bericht zum PC-Forschungspraktikum LMU (1999)
106. [Landgraf1996] S. Landgraf, G. Grampp, J. Inf. Rec. Mats., 23 (1996) 203.
107. [Landgraf2002] S. Landgraf, <http://www.cis.tugraz.at/ptc/landgraf/FLUORES.HTM>
108. [Langley1999] P. J. Langley, J. Hulliger, Chem. Soc. Rev. 28 (1999) 279.
109. [Levy1988] D. Levy, D. Avnir, J. Phys. Chem. 92 (1988) 4734.
110. [Li2001] Z. M. Li, Z. K. Tang, H. J. Liu, N. Wang, C. T. Chan, R. Saito, S. Okada, G. D. Li, J. S. Chen, N. Nagasawa, and S. Tsuda, Phys. Rev. Lett. 87 (2001) 127401.
111. [Lobo1997] R. F. Lobo, M. Tsapatsis, C. C. Freyhardt, S. Khodabandeh, P. Wagner, C.-Y. Chen, K. J. Balkus, S. I. Zones, M. E. Davis, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 8474.
112. [Lossau1996] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke, F. Pöllinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C.M. Silva, M.M. Yang, D.C. Youvan, M.E. Michel-Beyerle, Chem. Phys. 213 (1996) 1.
113. [Lounis2000] B. Lounis, H.A. Bechtel, D. Gerion, P. Alivisatos, W.E. Moerner, Chem. Phys. Lett. 329 (2000) 399.
114. [Lu1997] H. P. Lu, S. Xie, Nature 385 (1997) 143.
115. [Mais1997] S. Mais, J. Tittel, Th. Basche, C. Bräuchle, W. Göhde, H. Fuchs, G. Müller, K. Müllen, J. Phys. Chem. A 101 (1997) 8435.
116. [Mais2000] S. Mais, Dissertation 2000, Chemie LMU-München, ISBN 3-89791-108-6
117. [Marlow1994] F. Marlow, M. Wübbenhorst, J. Caro, JPC 98 (1994) 12315
118. [Marlow2000] F. Marlow, B. Spliethoff, B. Tesche, D. Zhao, Adv. Mat. 12 (2000) 961
119. [Matz1999] M. V Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, Nature Biotechnol. 17 (1999) 969.

120. [McCusker2001] L. B. McCusker, F. Lieberau, G. Engelhardt, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 381.
121. [Megelski2001] S. Megelski, A. Lieb, M. Pauchard, A. Drechsler, S. Glaus, C. Debus, A. Meixner, G. Calzaferri, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 25.
122. [Meinershagen1996] J.L. Meinershagen, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 449.
123. [Meinershagen1999] J. L. Meinershagen, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 448.
124. [Melles1999] Melles Griot, *Gaussian Beam Optics, Katalog* (1999)
125. [Minsky1961] M. Minsky U.S. Patent No 301467, Dec. (1961).
126. [Mitchell1983] D. J. Mitchell, J.T. Tiddy, L. Waring, T. Bostock, M.P. McDonald, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 79 (1983) 975
127. [Moerner1989] W.E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* 62 (1989) 2535.
128. [Moerner1999] W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* 283, 1670 (1999).
129. [Moerner2002] W.E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 910.
130. [Moller1998] K. Moller, T. Bein, *Chem. Mater.* 10 (1998) 2950.
131. [Müller1999] M. Müller, H.-J. Bär, S. M. Kast und J. Brickmann, *Chem. Phys. Letters*, 311 (1999) 485.
132. [Müller2000] M. Müller, Dissertation 2000, Chemie TU-Darmstadt, http://elib.tu-darmstadt.de/diss/000092/diss_1sided.pdf
133. [NDRL2001] Radiation Chemistry Data Center des Notre Dame Radiation Laboratory unter <http://allen.rad.nd.edu/>
134. [Nie1997] S. Nie, R. N. Zare, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 567 (1997).
135. [Niwa1996] H. Niva, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, F.I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 13617.
136. [Olmsted1997] I. Olmsted, *J. Phys. Chem.* 83 (1997) 2579
137. [Orrit1990] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* 65 (1990) 2716.
138. [Ozin2000] T. Asefa, C. Yoshina-Ishii, H.J. MacLachlan, G.A. Ozin, *J. Mater. Chem.* 10 (2000) 1751.
139. [Panzer1998] O. Panzer, W. Göhde, U.F. Fischer, H. Fuchs, K. Müllen, *Adv. Mater.* 10 (1998) 1469.
140. [Parak1993] F. Parak, H. Frauenfelder, *Physica A* 201 (1993) 332.
141. [Pariser1956] R. Pariser, *J. Chem. Phys.* 24 (1956) 250.
142. [Parker1960] C.A. Parker, W.T. Rees, *Analyst (London)* 85 (1960) 587.
143. [Pawley1995] J.B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York (1995).
144. [Press1992] W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, Brian P. Flannery, *Numerical Recipes in C*, Cambridge University Press, Cambridge (1992)
145. [Rathouseky1998] J. Rathousky, M. Zikalova, A. Zikal, J. Had, *Collect. Czch. Chem. Comm.*, 63 (1998) 1893.
146. [Rau1990] H. Rau, *Photochemistry and Photophysics*, Vol II. (Ed. J.F. Rabek), CRC Press, Boca Raton (1990) 119.
147. [Rau1999] JP. Rau, Dissertation Chemie, LMU-München (1999).
148. [Renn1988] A. Renn, S. e. Bucher, A. J. Meixner, E.C. Meister, U. Wild, *J. Luminescence* 39 (1988) 181.
149. [Richards1959] B. Richards, E. Wolf, *Proc. R. Soc. A*, 253 (1959) 358
150. [Riemann1998] S. Riemann, Dissertation 1998, Chemie Uni-Konstanz.
151. [Rigler1993] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.* 22 (1993) 169

152. [Rigler2001] Fluorescence Correlation Spectroscopy, R. Rigler, E.S. Elson (Eds.), Springer Series in Chemical Physics. VOL. 65 (2001)
153. [Rohlfing] Y. Rohlfing, Bremen.
154. [Roth1998] S. W. Roth, P. J. Langley, A. Quintel, M. Wübbenhorst, P. Rechsteiner, P. Rogin, O. König and J. Hulliger, *Adv. Mater.* 18 (1998) 10.
155. [Saxton1997] M.J. Saxton, K. Jacobson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997) 373.
156. [Scaiano1999] J.C. Scaiano, H. García, *Acc. Chem. Res.* 32 (1999) 783.
157. [Scandella1998] L. Scandella, G. Binder, T. Mezzacasa, J. Gobrecht, R. Berger, H.P. Lang, C. Gerber, J.K. Gimzewski, J.H. Koegler, J.C. Jansen, *Micro. Meso. Mat.* 21 (1998) 403.
158. [Schmidt1996] T. Schmidt, G. Schütz, W. Baumgartner, H. Gruber, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2926.
159. [Schomburg1996] C. Schomburg, D. Wöhrle, G. Schulz-Ekloff, *Zeolites* 17 (1996) 232
160. [Schomburg2001] C. Schomburg , M. Wark , Y. Rohlfing , G. Schulz-Ekloff and D. Wöhrle, *J. Mater. Chem.*,11 (2001) 2014.
161. [Schüth1995] F. Schüth, *Chemie in unserer Zeit* 29 (1995) 42.
162. [Schütz1997] G.J. Schütz, H. Schindler, T. Schmidt, *Biophys. J.* 73 (1997) 1073.
163. [Schwab2000] I. Schwab, Bericht zum PC-Forschungspraktikum LMU (2000).
164. [Schwarz1999] V. Schwarz, Dissertation 1999, Chemie LMU-München.
165. [Schwille1996] P. Schwille, Dissertation 1996, TU-Braunschweig, ISBN 3-930333-14-7
166. [Scott2001] R. W.J. Scott, S.M. Yang, G. Chabanis, N. Coombs, D.E. Williams, G. Ozin, *Adv. Mater.* 13 (2001) 1468.
167. [Seebacher1997] C. Seebacher, Diplomarbeit 1997, Chemie LMU-München.
168. [Seebacher1999] C. Seebacher, F.W. Deeg, C. Bräuchle, J. Wiehler, B. Steipe, *J. Phys. Chem. B*, 103 (1999) 7728.
169. [Seebacher2002] C. Seebacher, C. Hellriegel, F.W. Deeg, S. Altmaier, P. Behrens, K. Müllen, *J. Phys. Chem.* (2002) in Druck.
170. [Seisenberger2001] G. Seisenberger, M.U. Ried, T. Endress, H. Büning, M. Hallek, C. Bräuchle, *Science* 294 (2001) 1929.
171. [Sens1981] R. Sens and K. H. Drexhage, *J. Luminesc.*, 24 (1981) 709.
172. [Sick2000] B. Sick, B. Hecht, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* 85 (2000) 4482.
173. [Skinner1996] J.L. Skinner, W.E. Moerner, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 13251.
174. [Sonnleitner1999] A. Sonnleitner, G. J. Schütz, and T. Schmidt, *Biophys. J.* 77 (1999) 2638.
175. [Stearns1995] T. Stearns, *Curr. Biol.* 5 (1995) 262.
176. [Strickler1962] S.J. Strickler, R.A. Berg, *J. Chem. Phys.* 37 (1962) 814.
177. [Striebel1997] C. Striebel, K. Hoffmann, F. Marlow, *Micro. Mat.* 9 (1997) 43.
178. [Stucky1994] G.D. Stucky, A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Margolese, D. Kumar, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B.F. Chmelka, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 240 (1994) 187.
179. [Tamarat2000] Tamarat, Ph.; Maali, A.; Lounis, B.; Orrit, M.; *J. Phys. Chem. A.* 104 (2000) 1.
180. [Tang1998] Z.K. Tang, H.D. Sun, J. Wang, J. Chen, G. Li, *Appl. Phys. Lett.* 73 (1998) 2287.
181. [Thor2002] J. J. van Thor, T. Gensch, K.J. Hellingwerf, L.N. Johnson, *Nature Struct. Biol.* 9 (2002) 37.

182. [Tinnefeld2001] P. Tinnefeld, D.-P. Hertel, M. Sauer, J. Phys. Chem. A 105 (2001) 7989.
183. [Török1995] P. Török, P. Varga, G.R. Booker J. Opt. Soc. Am. A 12 (1995) 2136.
184. [Tsien1998] R. Tsien, Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 509.
185. [Vanderkooi1997] J.M. Vanderkooi, P.J. Angiolillo, M. Laberge, Methodes in Enzymology, Academic Press, San Diego, 278 (1997) 71.
186. [Völker1989] S. Völker, Annu. Rev. Phys. Chem. 40 (1989) 499.
187. [Wang2000] N. Wang, Z. K. Tang, G. D. Li, J. S. Chen, Nature 408 (2000) 50.
188. [Ward1982] W.W. Ward, H. Prentice, A.F. Roth, C.W. Cody, S.C. Reeves, Photochem. Photobiol 31 (1982) 803.
189. [Wark2000] M. Wark, G. Grubert, M. Warnken, G. Schulz-Ekloff, M. Ganschow, Y. Rohlfing, T. Bogdahn-Rai, D. Wöhrle, Applied Mineralogy, Eds. Rammimair et al., (2000) Balkema, Rotterdam, 253.
190. [Wazawa2000] T. Wazawa, Y. Ishii, T. Funatsu and T. Yanagida, Biophys. J. 78 (2000) 1561.
191. [Webb1996] R.H. Webb, Rep. Prog. Phys. 59 (1996) 427.
192. [Weidenthaler1994] C. Weidenthaler, R.X. Fischer, R.D. Shannon, O. Medenbach, J. Phys. Chem. 98 (1994) 12687.
193. [Weiss] Ö. Weiß, AK Schüth, MPI Kohlenforschung, Mülheim.
194. [Weiss1999] S. Weiss, Science 283, 1676 (1999).
195. [Wessels1999] T. Wessels, C. Baerlocher, L.B. McCusker, E.J. Creighton J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 6242.
196. [Weston1998] K.D. Weston, P.J. Carson, H. Metiu, S.K. Buratto, J. Chem. Phys. 109 (1998) 7474.
197. [Weston2001] K.D. Weston, L.S. Goldner, J. Phys. Chem. B 105 (2001) 3453.
198. [Widengren2000] J. Widengren, P. Schwille J. Phys. Chem. A 104 (2000) 6416.
199. [Wiehler2001] J. Wiehler, Dissertation Chemie, LMU-München (2001).
200. [Wiehler2002] J. Wiehler, B. Steipe, C. Seebacher, C. Bräuchle, A. Zumbusch, Eingereicht.
201. [Wild1996] Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy by T. Basché (Editor), W. E. Moerner (Editor), M. Orrit (Editor), U. P. Wild, VCH Weinheim (1996).
202. [Wöhrle1994] D. Wöhrle, G. Schulz-Ekloff, Adv Mat. 6 (1994) 875.
203. [Wöhrle1998] D. Wöhrle, M. Tausch, W. Stohrer, Photochemie, Wiley-VCH, Weinheim (1998).
204. [Wöhrle2001] D. Wöhrle, G. Schulz-Ekloff, I. Braun, C. Schomburg, F. Laeri, U. Vietze, M. Ganschow, Y Rohlfing, T. Bogdahn-Rai, J. Inf. Rec. 25 (2000) 87.
205. [Wu1994] C.G. Wu, T. Bein, Science 264 (1994) 1757.
206. [Xie1998] X. S. Xie, J. K. Trautman, Annu. Rev. Phys. Chem. 49, 441 (1998).
207. [Ying1999] J.Y. Ying, C.P. Mehnert, M.S. Wong, Angew. Chem. 38 (1999) 58.
208. [Yoon1994] K.B. Yoon, S.M. Hubig, J.K. Kochi, J. Phys. Chem 98 (1994) 3865.
209. [ZeissInfoNetz] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz, Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Grundlagen.
210. [Zeolithatlas1996] W.M. Meier, D.H. Olson, Ch. Baerlocher, Zeolites 17 (1996) 1.
211. [ZeolithatlasNetz] <http://www.iza-structure.org/>
212. [Zeotech2002] http://www.zeo-tech.de/html/d/d_fass1.htm

8 Anhang

8.1 Veröffentlichungen

C. Seebacher, F.W. Deeg, C. Bräuchle, J. Wiehler, B. Steipe
Stable low temperature photoproducts and hole burning of green fluorescent protein (GFP)

J. Phys. Chem. B 103 (1999) 7728.

C. Seebacher, J. Rau, F.W. Deeg, C. Bräuchle, S. Altmaier, R. Jäger, P. Behrens
Visualisation of Mesostuctures and Organic Guest Inclusion in Molecular Sieves with Confocal Microscopy

Advanced Materials 13 (2001) 1374.

C. Seebacher, C. Hellriegel, F. W. Deeg, C. Bräuchle, S. Altmaier, P. Behrens, K. Müllen

Observation of translational diffusion of single terrylendiimide molecules in a mesostructured molecular sieve.

J. Phys. Chem. B, 106 (2002) 5591.

J. Wiehler, B. Steipe, C. Seebacher, C. Bräuchle, and A. Zumbusch

Dimerization of the Green Fluorescent Protein (GFP) and mutagenic stabilization of its ground state forms

Eingereicht zum Biochemistry Journal im Dezember 2001.

C. Seebacher, C. Hellriegel, F.W. Deeg, C. Bräuchle "Confocal microscopy and spectroscopy for the characterization of host/guest materials." im Buch zum DFG Schwerpunktprogramm: "Host-Guest-Systems Based on Nanoporous Crystals: Synthesis, Properties and Applications"

Eingereicht Februar 2002

C. Seebacher, C. Hellriegel, C. Bräuchle, M. Ganschow, D. Wöhrle

Orientalional disorder and reorientation of single Oxazine dye molecules in a porous ALPO₄-5 host

in Vorbereitung

C. Seebacher, C. Hellriegel, C. Bräuchle, Y. Rohlfing, D. Wöhrle

Orientalional distribution of single Cy 5 dye molecules in MCM-41

in Vorbereitung

C. Seebacher, C. Bräuchle, K. Müllen

Terrylendiimide in PMMA: A reference system for single molecule spektroskopie.
in Vorbereitung

8.2 Tagungsbeiträge

3rd International Workshop on Single Molecule Detection, Berlin-Adershof, 24.9. - 27.9.97

Poster: Low Temperature and Single Molecule Spectroscopy of the Green Fluorescent Protein (GFP)

G. Jung, C. Seebacher, J. Tittel, F.W. Deeg, C. Bräuchle, J. Wiehler, B. Steipe

DPG-Frühjahrstagung, Sektion Chemische Physik, Bayreuth 9.3. - 13.3.1998
Poster Optical low temperature spectroscopy of green fluorescent protein (GFP)
C. Seebacher, F.W. Deeg, C. Bräuchle, J. Wiehler, B. Steipe

DPG-Frühjahrstagung, Sektion Chemische Physik, Münster 22.3.99 - 26.3.99
Poster: Confocal microscopy and spectroscopy of organic chromophores in nanoporous crystals
C. Seebacher, J. Rau, S. Mais, F.W. Deeg, C. Bräuchle

CeNS Tagung, Venedig 19.4.99 - 22.4.99
Poster: A new class of nanostructured materials: Microscopy, spectroscopy and applications of organic chromophores in molecular sieves.
C. Seebacher, J. Rau, R. Baumann, S. Mais, F. W. Deeg, C. Bräuchle

SFB1751 Vorstellungspräsentation, München 10.5.99 - 11.5.99
Poster: Optische Manipulation von einzelnen Molekülen in nanoporösen Kristallen.
C. Bräuchle, F.W. Deeg, S. Mais, C. Seebacher, T. Ruppert, P. Zehetmayer

DFG Schwerpunktsprogramm: Nanoporöse Wirt/Gast-Systeme, Bonn 24.6.99-25.6.99
Poster: Räumliche und optische Heterogenitäten in nanoporösen Gast / Wirt - Systemen
C. Seebacher, T. Ruppert, J. Rau, F. W. Deeg, C. Bräuchle

Tagung der VW-Stiftung, Wiesbaden 14.7.99 - 16.7.99
Poster: Confocal microscopy and spectroscopy of organic guests in porous molecular sieves.
C. Seebacher, J. Rau, S. Mais, F. W. Deeg, C. Bräuchle

Internationale Holeburning Konferenz, Bordeaux 19.9.99 - 23.9.99
Vortrag: Low-temperature fluorescence spectroscopy and photochemistry of GFP.
C. Seebacher, S. Mais, G. Jung, F.W. Deeg, A. Zumbusch, C. Bräuchle

CeNS-Tagung, Schliersee 3.10.99 - 5.10.99
Vortrag: Confocal laser-scan-microscopy. Application: Nanoporous guest / host systems
C. Seebacher

Sci & Ski - Tagung der ETH Zürich, Engelberg 20.3.2000 - 24.3.2000
Vortrag: Nanoporous guest / host materials as optical devices.
C. Seebacher, F. W. Deeg, C. Bräuchle

DPG-Schwerpunktsprogramm: "Nanoporöse Kristalle", Doktorandenseminar, Kaub 6.11.2000 - 8.11.2000
Vortrag: Konfokale Mikroskopie und Einzelmolekülspektroskopie von organischen Farbstoffen in Molekularsieben.
C. Seebacher, F.W. Deeg, C. Bräuchle

BASF, Ludwigshafen, 16.10.2000 - 17.10.2000
Vortrag: Orientierung und Dynamik von Farbstoffmolekülen in Nanoporen.
C. Seebacher, F.W. Deeg, C. Bräuchle

CeNS-Winterschool: Sensing and Manipulating in the Nanoworld, Mauterndorf 18.2.2001 - 23.2.2001

Poster: Confocal microscopy and single molecule spectroscopy of organic guests in nanoporous molecular sieves.

C. Seebacher, C. Hellriegel, F.W. Deeg, C. Bräuchle, S. Altmaier, R. Jäger, P. Behrens, M. Ganschow, D. Wöhrle, G. Schulz-Ekloff

13. Deutsche Zeolithtagung, Erlangen-Nürnberg, 7.3.2001 - 9.3.2001

Poster: Dynamics of Single Chromophores in Porous Host/Guest Systems.

C. Seebacher, C. Hellriegel, T. Ruppert, F.W. Deeg, C. Bräuchle, S. Altmaier, R. Jäger, P. Behrens, M. Ganschow, D. Wöhrle, G. Schulz-Ekloff

Sci & Ski - Tagung der ETH Zürich, Andermatt, 19.3.2001 - 23.3.2001

Vortrag: Single Molecules in Molecular Sieves

C. Seebacher, C. Hellriegel, F.W. Deeg, C. Bräuchle

CeNS-Workshop: Nanoscience: Tools and Devices, Venedig 24.9.2001 - 28.9.2001

Poster: Single Molecule Microscopy and Spectroscopy in Nanostructured Molecular Sieves.

C. Seebacher, C. Hellriegel, F.W. Deeg, C. Bräuchle, M. Ganschow, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, S. Altmaier, R. Jäger, P. Behrens

8.3 Farbstoffe

Name	Absmax. [nm]	Extinktion [L/mol*cm]	Flmax. [nm]	FLQA	FlLeben. [ns]	Photozyklen 10 ^x	Größe [nm]
p-Terphenyl	275,00	32100,00	339,00				
Tryptophan	278,00	5000,00	360,00	0,12			
Azobenzol	320,00	22000,00	500,00	0,00			
Pyrene	335,00	50000,00	390,00	0,30	200,00		
Eu3+	340,00	10,00	617,00	0,01	5E5		0,20
POPOP	360,00	0,00	420,00	0,97	1,35		0,82
Anthracene	375,00	0,00	379,00	0,28	5,50		
Cumarin 102	389,00	21500,00	465,00				
wtGFP	400,00	30000,00	510,00	0,60	3,00		2,00
Coumarin 153	422,00	18900,00	529,00	0,60	4,854		
Perrylen	438,00	40000,00	450,00	0,94	5,006		0,92
9,10-Bis(phenylethynyl) anthracene	451,00	35000,00	470,00	1,00			
Beta-carotene	451,00	140000,0	0,00	1E-4			
Tris(bipyridyl) rutheniumII	452,00	15000,00	610,00	0,04			
PECA	466,00	18000,00	477,00	0,90	15,00		
DCM	472,00	42500,00	650,00	0,43	2,00		1,10
Tetracen	474,00	32000,00	480,00	0,60		6	0,72
Diethylaminostyryl pyridin	480,00	20000,00	620,00	0,10	1,005		0,74
Dimethylaminostyryl pyridin	480,00	20000,00	0,00				0,70
DOCI	485,00	126000,0	504,00				0,80

Pyronin	490,00		520,00				0,72
Fluorescein	500,00	95000,00	540,00	0,97			
Pyridin2	500,00		700,00				0,70
Fluo-3	506,00	78000,00	526,00	5,1E-3			
Perylenimid	510,00	75000,00	535,00	0,95	5,00		
Crystal violet	510,00	110000,0	0,00	0,01			
Rhodamin 110	510,00	89900,00	535,00				
Nilrot	520,00	28000,00	580,00	0,70			
Perylendiimid	526,00	90000,00	533,00	0,98	4,008		0,92
Rhodamin 590	530,00	97000,00	556,00				
Rhodamin 6G	530,00	110000,0	556,00	0,95	4,008		
Rhodamin B	552,00	107000,0	580,00		3,00		
TMR	553,00	103000,0	576,00			7	
Styryl8	560,00	38000,00	720,00		3,005		0,80
Terrylen	561,00	65000,00	575,00	1,00	3,507		0,92
Porphin	563,00	6000,00	630,00	0,04			1,10
Cy3	564,00	130000,0	582,00	0,10			
Rhodamin 101	568,00	95000,00	630,00				
Sulforhodamin 101	576,00	135000,0	690,00	0,90			
Oxonin	580,00		600,00				0,72
Resorufin	580,00		0,00				
DODCI	582,00	240000,0	607,00	0,50	1,20		
Pentacen	582,00		585,00		6,00		0,72
Texas Red	595,00	85000,00	615,00	0,51			
Thionin	599,00	53000,00	625,00	0,03	0,366		0,72
C60	600,00	0,00	730,00	1E-04			
Cresylviolet	603,00	83000,00	640,00	0,54	3,50		
DCI-2	607,00	124000,0	625,00		0,01		
Oxazin 4	615,00	109000,0	650,00	0,62	3,10		0,72
MalachitGreen	616,00	150000,0	0,00	0,00			
Oxazin 170	620,00	83000,00	660,00	0,63	3,00		1,00
8EthylPorphin	620,00	7000,00	630,00	0,13			1,50
SquaryliumIII	627,00	300000,0	650,00	0,65			
Nilblau	630,00	77500,00	664,00	0,27	1,565		0,80
Dil(C1)	637,00	130000,0	668,00		0,80		0,85
HIDCI	639,00	225000,0	660,00	0,40		5	
Oxazin1-Methyl	640,00		660,00				0,80
Oxazin1	645,00	130000,0	670,00	0,19	1,006		0,87
Cy5	645,00	215000,0	680,00	0,30	1,506		1,25
MR121	650,00		675,00		2,40		0,80
Tetrahydroxyteraphenyl porphin	651,00		660,00				
DTDCI	653,00	223000,0	675,00	0,35	1,30		
Terrylendiimid	655,00	95000,00	670,00	1,00	3,4010		0,91

Rhodamin 700	657,00	92500,00	682,00		2,70		1,00
Methylenblau	660,00	75000,00	675,00	0,04	0,30		0,82
Oxazin 750	666,00	82500,00	678,00		1,88		1,10
ZnPhthalocyanin	675,00	280000,0	685,00	0,30			1,60
HITC-indol	740,00						0,85
Cy7	765,00	200000,0	795,00	0,00			

8.4 GFP-Spektren

Die folgenden Graphen sind alle gleich kodiert. Dicke Linien zeigen die Fluoreszenzanregungsspektren (Detektionswellenlänge etwa 20 nm hinter dem Ende der Kurve), die dünnen Linien sind Fluoreszenzspektren (Anregungswellenlänge typisch 5 nm kurzweilig vor dem Beginn des Spektrums). Photoprodukte werden durch eine entsprechende gepunktete Linie dargestellt. Ist eine Unterscheidung zwischen dem protonierten (A) Zustand und dem deprotonierten (B,l) notwendig, so wird A durchgezogen und B gestrichelt eingezeichnet (siehe Abbildung 243).

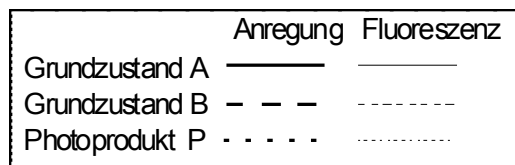


Abbildung 243: Linienkodierung der GFP-Spektren.

8.4.1 Wildtyp

Abbildung 244 zeigt eine Auswahl von Anregungs- und Fluoreszenzspektren von wt-GFP.

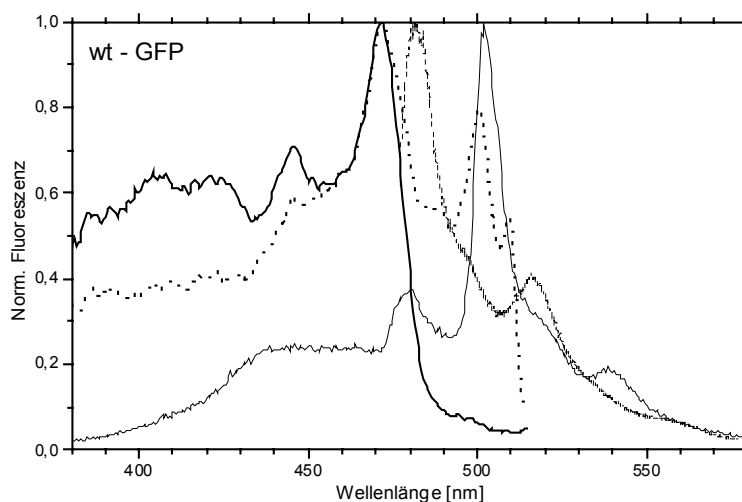


Abbildung 244: Spektren von wt-GFP.

Bei intensiver Bestrahlung der blauen Absorptionsbande (A) bilden sich zwei Photoprodukte bei 501 nm (P501) und 510 nm (P510). Bei intensiver Bestrahlung der türkisen Absorptionsbande (B) bilden sich ein Photoprodukte bei 489 nm (P489). Die Fluoreszenzspektren zeigen einen typischen, zum roten Spektralbereich immer

kleiner werdenden Stokes-Shift. Mit der 482,5 nm Linie des Kr-Ionen Lasers ist auch spektrales Lochbrennen möglich.

8.4.2 Thr203Val

Bei dieser Variante wird versucht durch die Entfernung der Hydroxidgruppe an Thr203 die B Form zu destabilisieren. Dadurch tritt bevorzugt die A und I Form auf. Siehe Abbildung 245. Bei intensiver Bestrahlung der A-Form bilden sich bei 506 und 512 nm zwei Photoprodukte die bei etwa 90 K wieder zerfallen.

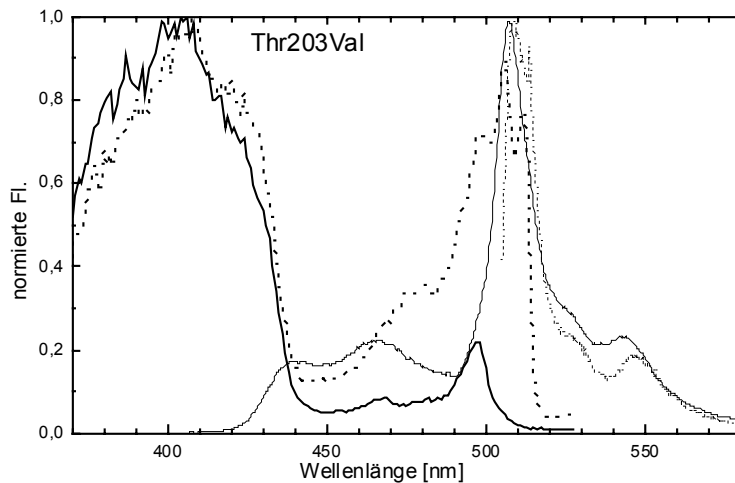


Abbildung 245: 2 K Spektren von Thr203Val.

8.4.3 Glu222Gln

In dieser Variante wurde die Säurestärke des Protonenakzeptors Glu222 durch den Austausch mit einer Säureamidgruppe Glu222Gln erniedrigt, wodurch eine Destabilisierung der A-Form auftritt. Dadurch verschiebt sich das Grundzustandsgleichgewicht auf die Seite der anionischen (B) Form. Dabei bleibt noch ein geringer Anteil der I-Form (~500 nm) zurück. Bei intensiver Bestrahlung bildet sich bei ~514 nm ein Photoprodukt, daß erst beim Erwärmen auf ~100 K wieder zerfällt.

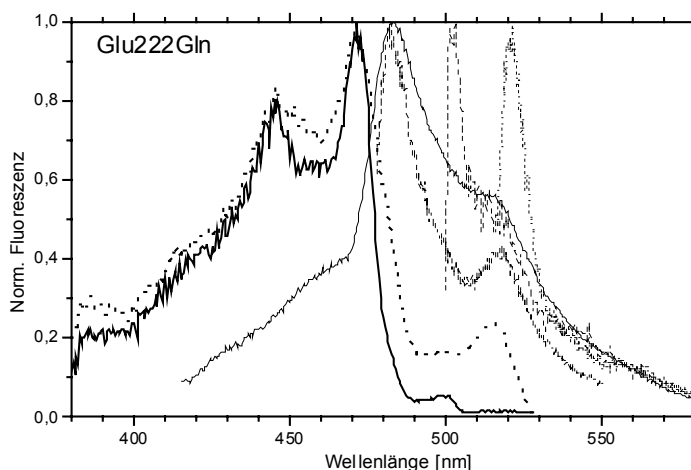


Abbildung 246: 2 K Spektren von Glu222Gln.

8.4.4 Thr203Val Glu222Gln

Die Anwendung der beiden zuvor beschriebener Mutationen Thr203Val und Glu222Gln wird sowohl die A Form als auch die B Form destabilisiert. Übrig bleibt die I Form [Wiehler2002]. Das Tieftemperatur-Anregungsspektrum der anionischen Form (~500 nm) ist ungewöhnlich breit. Vermutlich befinden sich darunter zwei Sub-Populationen. Die Fluoreszenzspektren sind dagegen sehr schmal und strukturiert. Dem gegenüber ist das Fluoreszenzspektrum der A-Form sehr breit, unstrukturiert und in den blauen Spektralbereich verschoben. Vermutlich ist hier kein ESPT mehr vorhanden. Bei intensiver Bestrahlung der A-Form bildet sich bei 535,5 nm ein Photoprodukt, daß erst beim Erwärmen auf 100 K wieder zerfällt.

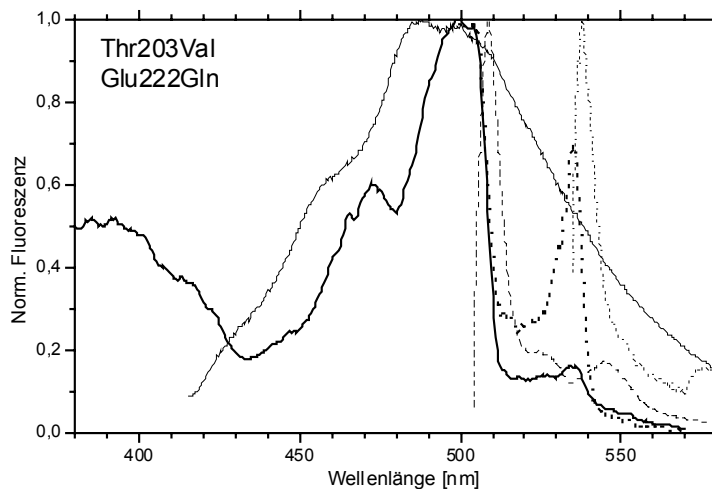


Abbildung 247: 2 K Spektren von Thr203Val Glu222Gln

8.4.5 Ser65Gly

Einen deutlichen Temperatureffekt zeigt die Ser65Gly Variante. Erst bei sehr tiefen Temperaturen wird die Fluoreszenzanregung des protonierten Chromophors bei ~400 nm sichtbar. Am anionischen Teil des Spektrums (~486 nm) ist auch gut erkennbar wie sich beim Abkühlen die spektrale Auflösung etwas verbessert.

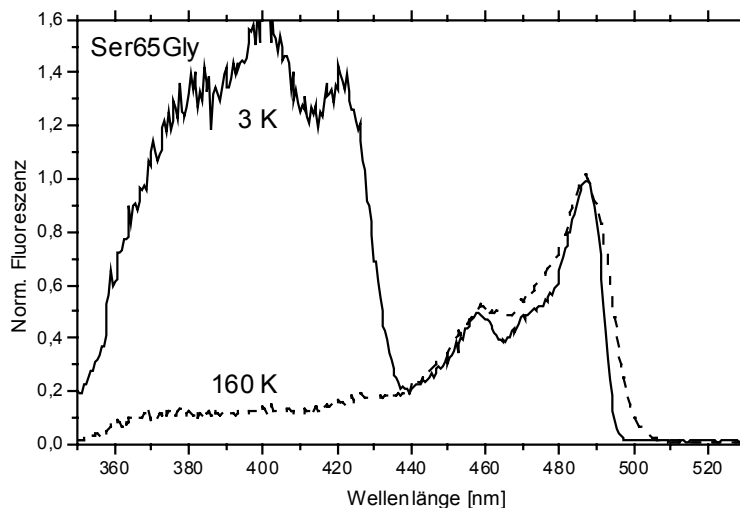


Abbildung 248: 2 K Spektren der Variante Ser65Gly.

8.4.6 Rot fluoreszierendes Protein (DsRed)

Dieses stark rotverschobene Protein wurde erst vor kurzen in der Koralle *Discosoma* entdeckt [Matz1999]. Die Struktur ist dem GFP sehr ähnlich, jedoch ist der Chromophor durch eine weitere Oxidation etwas vergrößert [Gross2000].

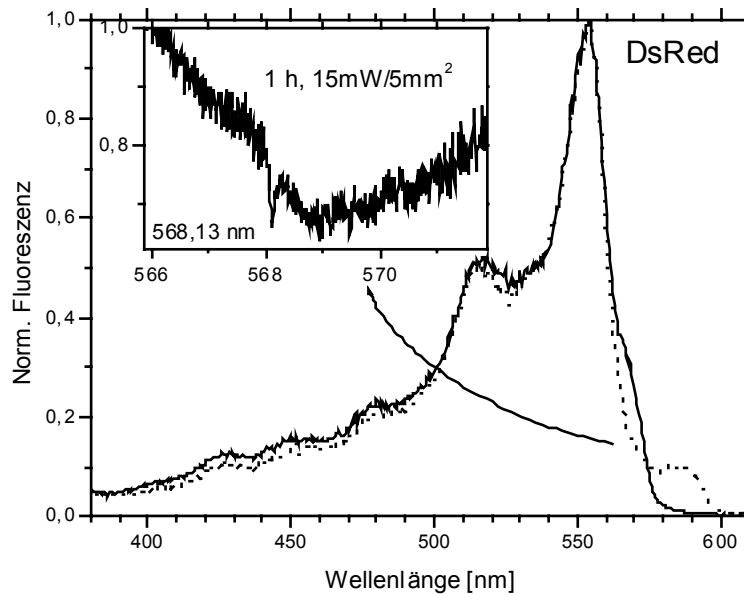


Abbildung 249: 2 K Spektren von DsRed.

Nach Bestrahlung mit 568 nm kann ein spektrales Loch im Anregungsspektrum detektiert werden. Zugleich bildet sich dabei ein Photoprodukt mit einer Absorption bei ~ 685 nm. Bereits bei sehr geringen Temperaturen (~20 K) zerfällt dieses wieder.

8.4.7 Thr203Tyr

In dieser Variante wird nahe am Chromophor ein zusätzlicher Aromat eingeführt. Aufgrund von π - π Wechselwirkungen tritt dadurch eine leichte Rotverschiebung auf. Auffällig ist hier die relativ starke Fluoreszenz aus dem A* Zustand (~ 450 - 500 nm). Durch intensive Bestrahlung der A-Form bildet sich ein Photoprodukt mit einer Absorption bei 514,5 nm. Dieses Photoprodukt zerfällt erst bei einer Temperatur von ~120 K.

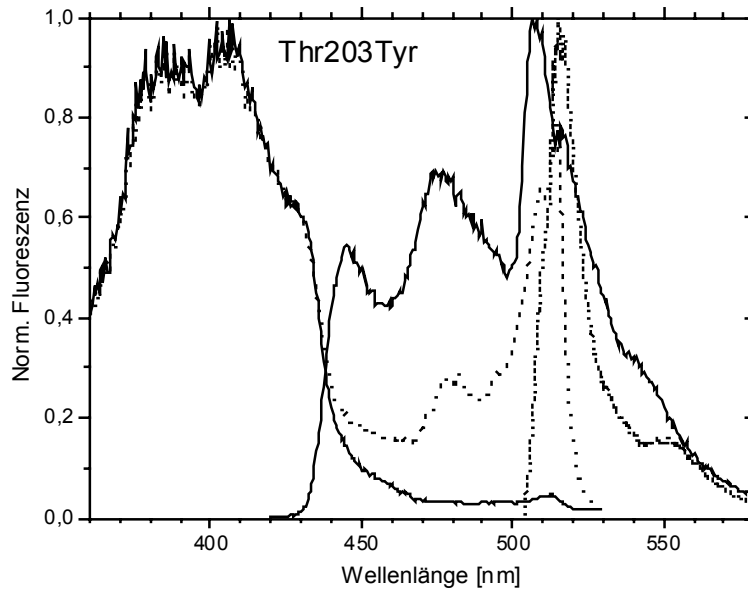


Abbildung 250: 2 K Spektren von Thr203Tyr.

8.4.8 Thr203Tyr Ser65Gly

Diese Variante zeigt ein ungewöhnlich schmales Fluoreszenzanregungsspektrum und Fluoreszenzspektrum der anionischen Form (~ 514 nm). In diese Bande kann sehr gut ein spektrales Loch gebrannt werden. Das Fluoreszenzspektrum der protonierten A-Form dagegen ist ungewöhnlich breit und unstrukturiert.

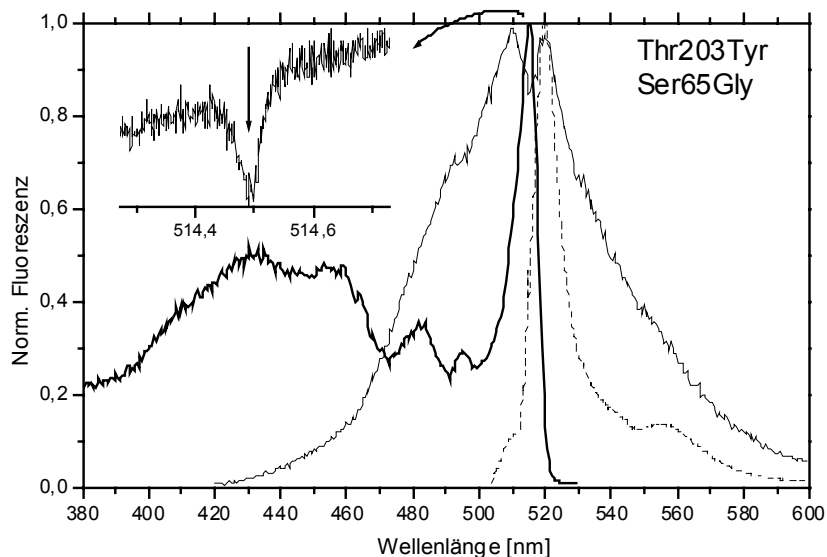


Abbildung 251: 2 K Spektren der Variante Thr203Tyr Ser65Gly.

8.4.9 Thr203Tyr Glu222Gln

In dieser Variante sind unter den anionischen Fluoreszenzanregungsspektrum (~ 510 nm) vermutlich zwei Zustände vorhanden, da sowohl die Anregungs- als auch die Fluoreszenzspektren in diesem Bereich zwei Maxima besitzen. Bei längerer Bestrahlung mit 407 nm taucht im Fluoreszenzspektrum eine Schulter bei 538 nm

auf. Diese ist vermutlich auf ein Photoprodukt mit einer Absorption bei etwa 535 nm zurückzuführen.

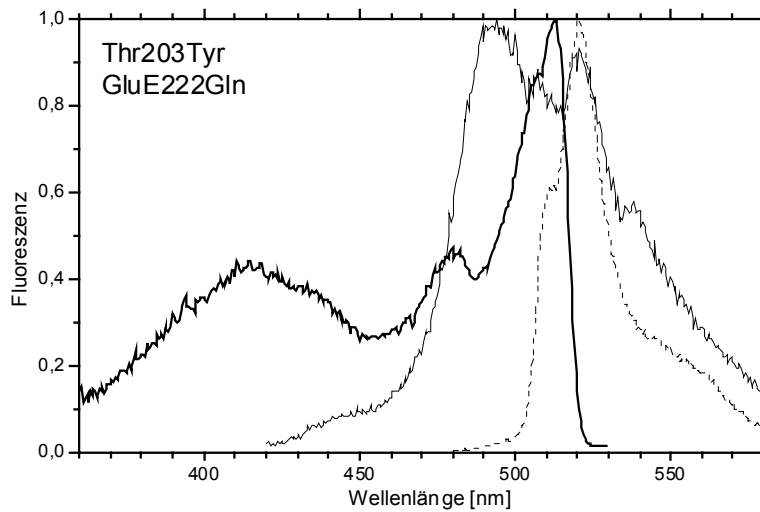


Abbildung 252: 2 K Spektren der Variante Thr203Tyr Glu222Gln.

8.4.10 Glu222Gln Ser65Gly

Trotz Glu222Gln Mutation ist in diese Variante die A-Form (~400 nm) vorhanden. Dies zeigt eine starke Begünstigung der A-Form durch die zusätzliche Ser65Gly Mutation.

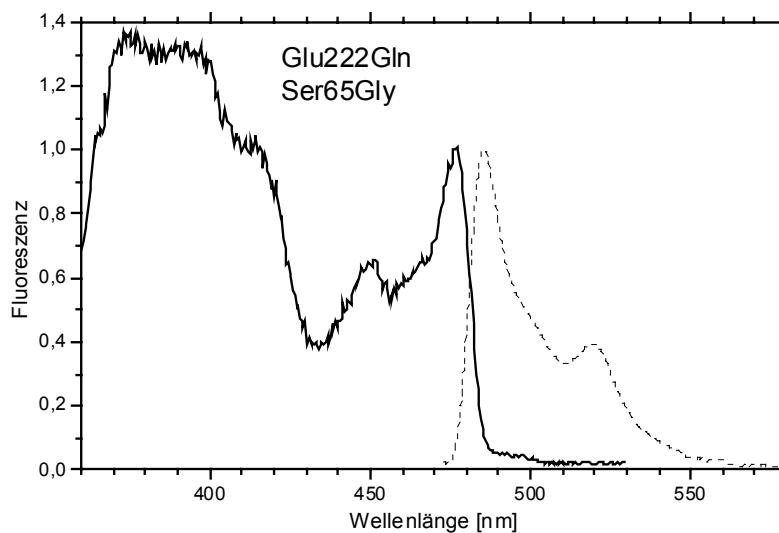


Abbildung 253: 2 K Spektren der Variante Glu222Gln Ser65Gly.

8.4.11 Thr203Val Glu222Gln Ser65Gly

Diese Dreifachmutation zeigt einen hohen Anteil der A-Form bei ~400 nm.

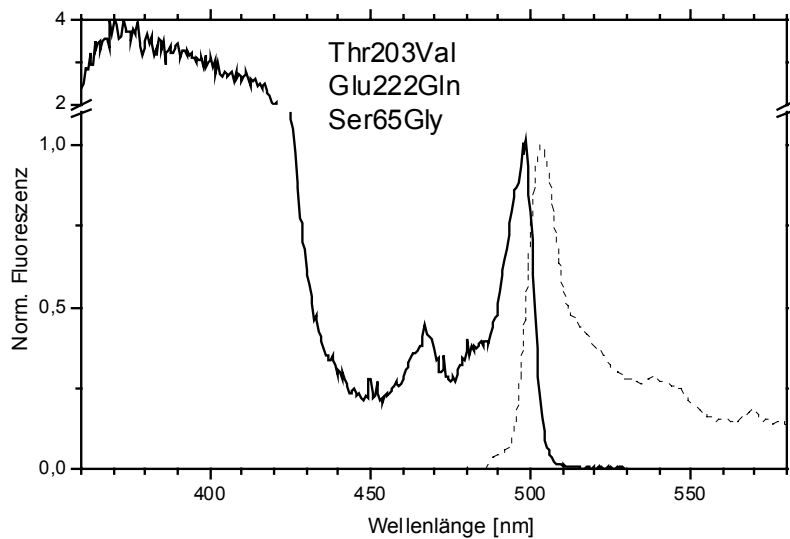


Abbildung 254: 2 K Spektren der Variante Thr203Val Glu222Gln Ser65Gly

8.4.12 Thr203Tyr Glu222Gln Ser65Gly

Diese Dreifachvariante besitzt wie alle anderen Thr203Tyr Varianten ein leicht rotverschobenes Spektrum.

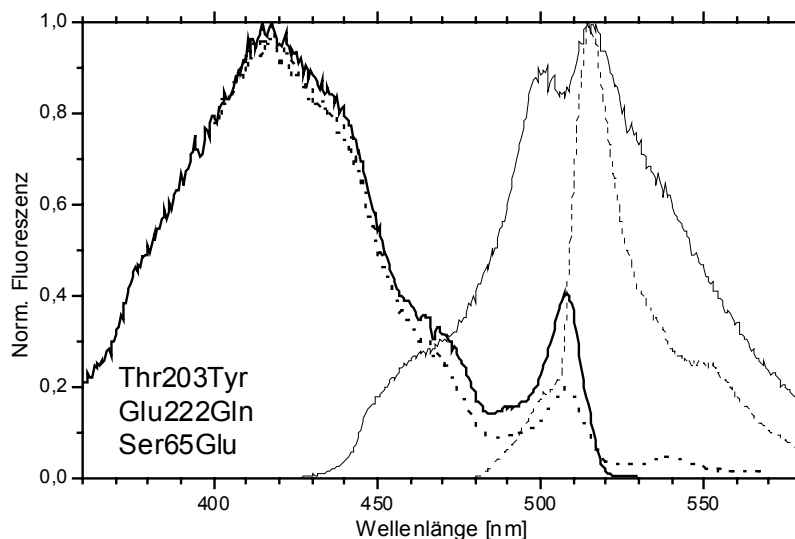


Abbildung 255: 2 K Spektren der Variante Thr203Tyr Glu222Gln Ser65Gly

8.4.13 EGFP (Ser65Thr Phe64Leu)

Diese Variante wurde auf einen möglichst rotverschobenen, anionischen Chromophor optimiert. Unter intensiver Bestrahlung (476 nm) bildet sich ein Photoprodukt bei 528 nm das erst beim Erwärmen auf ~85 K wieder zerfällt. Die asymmetrische Änderung des Bleichspektrums und die zwei Fluoreszenzmaxima (485, 499 nm) zeigen mindestens zwei Sub-Populationen des anionischen Chromophors.

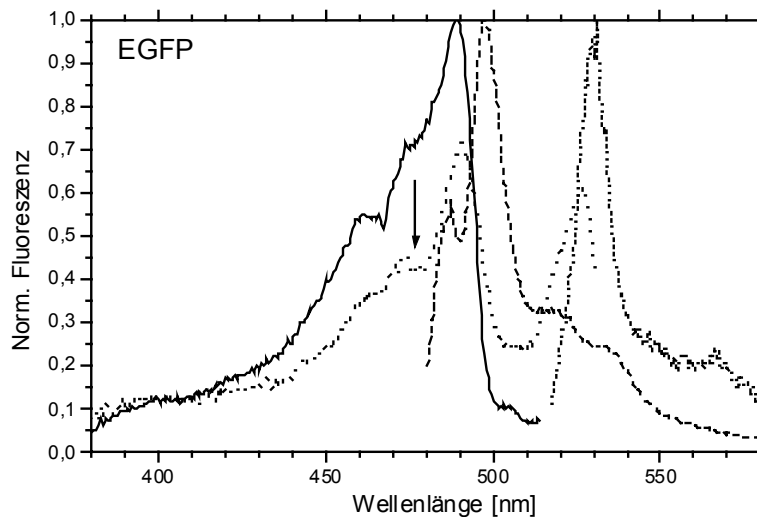


Abbildung 256: 2 K Spektren der EGFP Variante.

8.4.14 Tyr66Trp

Diese Variante besitzt einen Veränderten Chromophor. Die Phenylgruppe wurde hier durch ein aromatische System ohne Hydroxydgruppe ersetzt. Doch auch hier bildet sich beim Bestrahlen ein Photoprodukt (~497 nm) das bei 93 K wieder zerfällt.

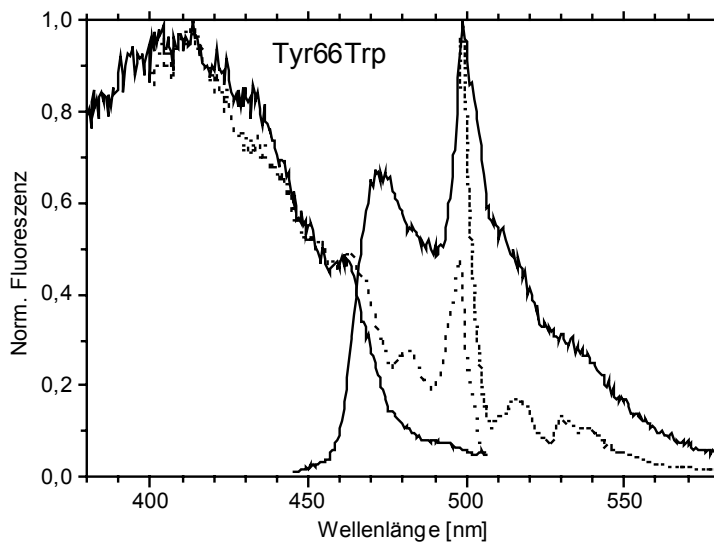


Abbildung 257: 2 K Spektren der Variante Tyr66Trp.

8.5 Programme

8.5.1 Scripten für Origin 6

8.5.1.1 Autocorrelieren im Script Fenster:

Spalte daten mit einer Anzahl von nmax Werten (die Korrelation muß über etwas weniger Werte durchgeführt werden da sonst Müll entsteht).

```
col(c)=corr(col(Daten),col(daten),data(1,nmax-11),nmax-10);
```

8.5.1.2 Normieren im Column Value Fenster:

```
col(cNorm) = col(c)/(nmax+1-[i])
```

8.5.1.3 Falten von zwei Spalten:

```
Spalte puls mit daten von 1 bis 65
Spalte Exp mit Daten von 100 bis 750
Spalte conv mit lauter 0, nicht markiert
for(i=100;i<=750;i+1){
for(j=1;j<=65;j+1){
col(conv)[i+j]=col(Exp)[i]*col(puls)[j];
}};
```

8.5.1.4 Löschen von Ausreißern (Hier Werte in Spalte c < 0):

```
/*aus column c Ausreiser löschen */
for(i=1;i<=14999;i+1){
if (col(c)[i] < 0) {
col(c)[i]="";
}};
```

8.5.1.5 Auszeitenhistogramm (hier aus fl < 200):

```
Spalte fl mit Daten von 1 bis 100000
Spalte histo mit lauter 0, nicht markiert
1. Wert in histo ist Unbrauchbar.
2. Wert in histo ist die Anzahl einzelner Pausen.
3. Wert in histo ist die Anzahl doppelter Pausen etc.
/*column histo auf null!!!*/
m=1;
for(i=1;i<=100000;i+1){
if (col(fl)[i] <= 200) m=m+1;
else {col(histo)[m] += 1;m=1;}
};;
```

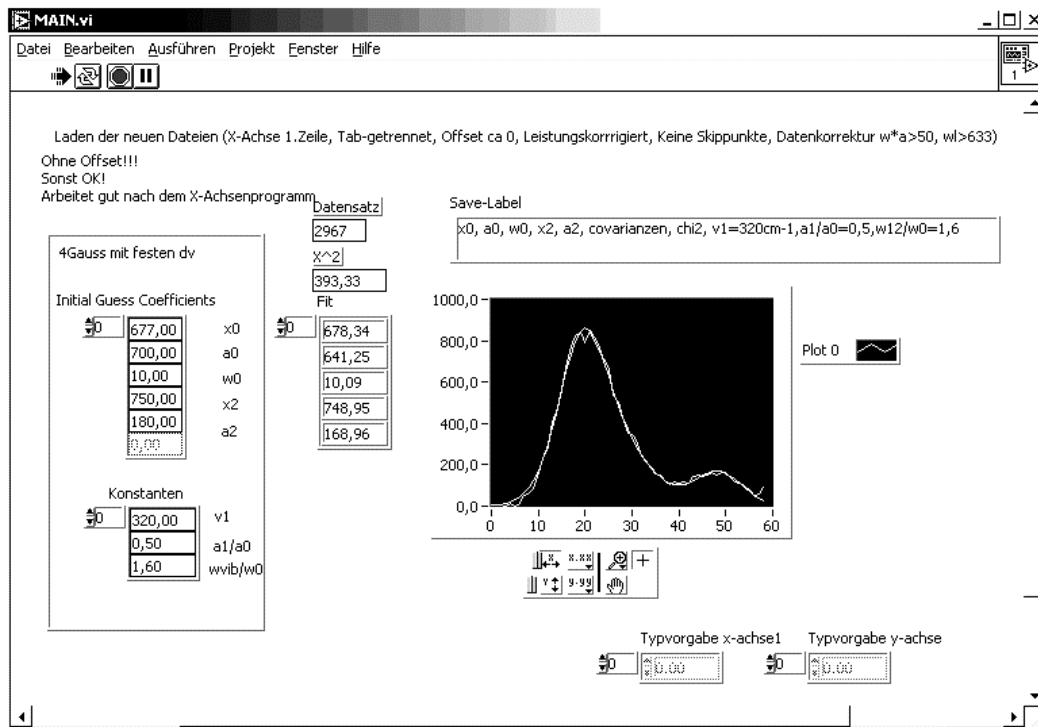
8.5.2 Labview Programme

8.5.2.1 Korrektur der Spektren des Prismenspektrographen

Dieses Programm korrigiert die nichtlineare Dispersion des Prismas. Zuerst werden zur Bestimmung des Untergrundes diejenigen Spektren ausgesucht, bei denen das einzelne Molekül "aus" ist. Anschließend wird die Wellenlängenachse rekonstruiert und die Intensität korrigiert. Das Programm ist zur Korrektur von sehr vielen Fluoreszenzspektren ausgelegt.

8.5.2.2 Anpassen von vielen Spektren mit Gaußkurven

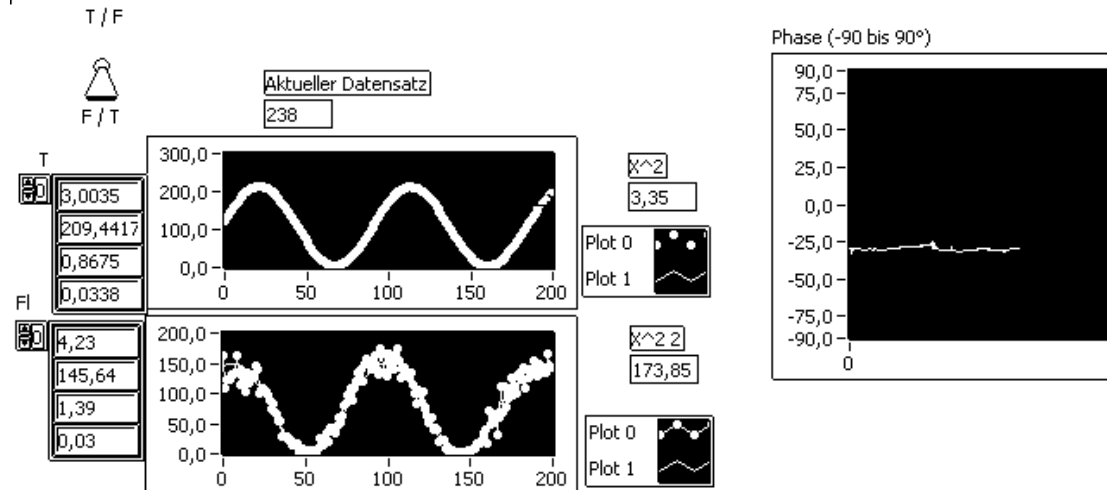
Werden sehr viele Fluoreszenzspektren gemessen können diese nicht mehr einzeln analysiert werden. Daher wird hier ein Programm entwickelt, das sehr viele Spektren mit Gaußkurven anpassen kann. Das folgende Bild der Bedienoberfläche zeigt wie gerade das 2967ste Spektrum mit 3 Gaußkurven angepaßt wurde.



8.5.2.3 Analyse von Orientierungsänderungen

Mit diesem Programm können die Messungen bei sich drehender Anregungspolarisation auf Orientierungsänderungen untersucht werden. Dazu wird ein kurzer Ausschnitt der Messung mit einer \cos^2 Kurve angepaßt und die Phasendifferenz zur Referenzkurve bestimmt. Im folgenden Ausschnitt aus der Bedienoberfläche sieht man auf der linken Seite die Kurvenanpassungen und rechts den Verlauf des Orientierungswinkels.

|Vertausche Datensatz 2 und 3



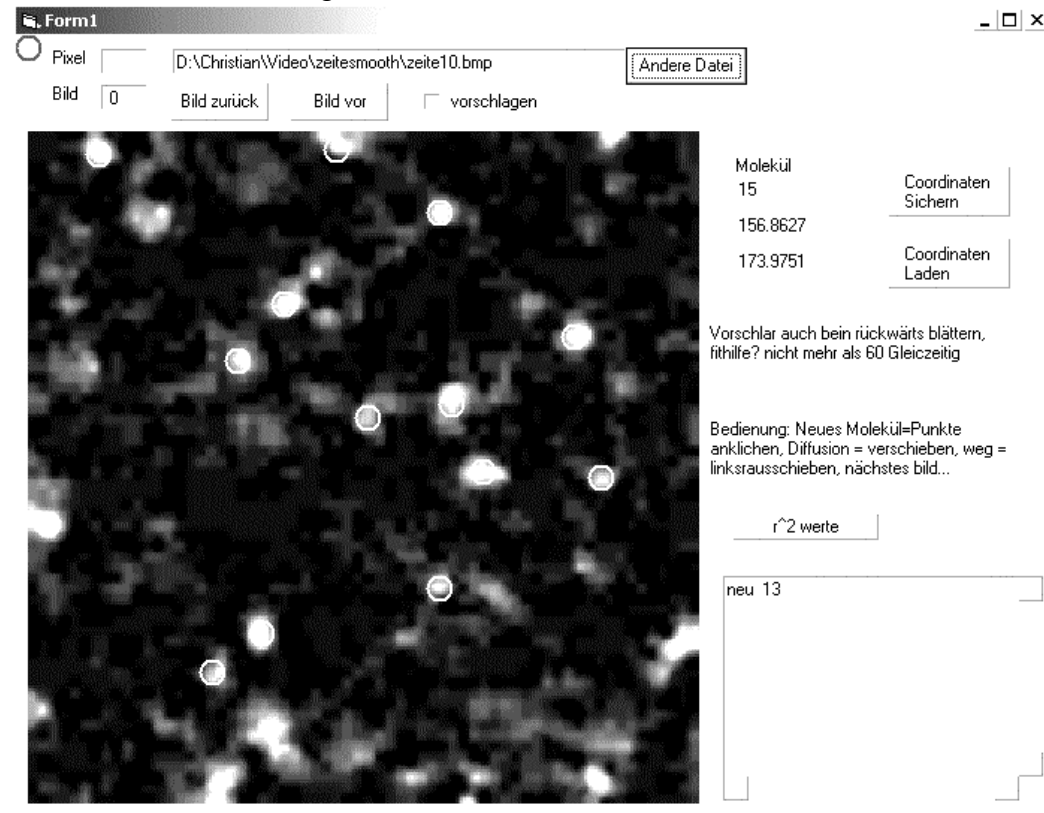
8.5.2.4 Weitere Labview-Programme

- Aufnahme und Verarbeitung von Fluoreszenzzeitspuren mit 12,5 ns Zeitauflösung
- Scanprogramm für ein konfokales Mikroskop auf der Basis von NI-Zähler- und NI-Analog-Computerkarten
- Programm zur Simulation von Meßdaten mit Poisson-Rauschen
- Programm zur Aufnahme von Spektren mit dem SR-400 Photoncounter unter Verwendung des Spex 1402 oder Jobin-Yvon H10D (Seriell/GPIB)

8.5.3 Visual-Basic Programme

8.5.3.1 Computerunterstützte Analyse von Einzelmoleküldiffusion

Dieses Programm hilft bei der Analyse von Bildsequenzen in denen sich die Positionen einzelner Moleküle verändern. Dazu werden die Molekülpositionen vom Benutzer mit Ringen markiert. Im nächsten Bild zeichnet das Programm dicke Ringe an die zuvor bestimmte Position ein. Der Benutzer muß dann entscheiden ob des Molekül unverändert, gewandert oder verschwunden ist.



8.5.3.2 Konvertierung von Meßdaten:

Für diverse Meßrechner wurden Konverter geschrieben, die die Meßdaten in das ASCII Format umwandeln: ALV5000, Asystant, SPC-300, MCS.

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. C. Bräuchle für die Themenstellung, sein begeistertes Interesse an dieser Arbeit, die ausgezeichnete Infrastruktur in seinem Arbeitskreis und den großen Freiraum bei der Durchführung der Arbeit.
- Fred-Walter Deeg für die Unterstützung in den ersten Jahren dieser Arbeit, die Diskussionen und Ratschläge.
- Andreas Zumbusch für die nette Begleitung bei Konferenzen.
- Christian Hellriegel für den Spaß bei der Arbeit, die vielen Diskussionen und die Mitwirkung bei den Experimenten.
- Erwin Kneuper für die dauernde Versorgung mit Kohlehydraten.
- Gregor Jung für sein farbiges Auftreten.
- dem akad. Rat Moriz Ehl für seine Ratschläge, die Cappuccino-Runden im Klinikum und die geschickten Einteilungen zu Praktikum.
- den Bürokollegen Thomas Ruppert, Alexander Schiller für die gute Stimmung im Büro.
- den ehemaligen Mitarbeitern Jenspeter Rau, Robert Baumann, Veronika Schwarz und Camilla Ferrante für die guten Zeiten im alten Institut.
- allen Kooperationspartnern, insbesondere Jens Wiehler, Öclem Weiß, Stefan Altmaier, Ralph Jäger für die Proben.
- meinen F- Praktikanten Wolfgang Eckardt, Eveline Lançon, Ingo Schwab, Sebastian Knörr und Sven Bornemann für ihre interessierte Mitarbeit.
- der Elektronikwerkstatt und der Feinmechanischen Werkstatt für ihre Arbeiten
- Frau Steger und allen andern Angestellten des Institutes für die verwaltungstechnischen Hilfestellungen.
- dem CeNS und der ETH-Zürich für geniale Tagungen.
- meinen Eltern, Geschwistern und all meinen Freunden für ihre Unterstützung während der letzten Jahre
- und besonders meiner Freundin Natalia.

Lebenslauf:

Persönliche Angaben

Name: Seebacher Christian Florian
Anschrift: Sämannstraße 19, 82166 Lochham
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 8. Juli 1970
Geburtsort: München

Schulbildung

1977 - 1981 Grundschule Gräfelfing
1981 - 1984 Kurt Huber Gymnasium, Gräfelfing
1984 - 1991 Feodor Lynen Gymnasium, Planegg
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1991 - 11/1996 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians Universität München
11/1996 Hauptdiplomprüfung Chemie
1/1997 - 7/1997 Diplomarbeit bei Prof. Bräuchle am Institut für Physikalische Chemie der Ludwig-Maximilians Universität München

Promotion

seit 9/1997 Bearbeitung des vorliegenden Themas und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Physikalische Chemie bei Prof. Bräuchle.