

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

Spektroskopie und Mikroskopie
einzelner Farbstoffmoleküle im Festkörper
zwischen 1,4 Kelvin und Raumtemperatur

Stefan Mais

aus
München

2000

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 18. Januar 2000

Stefan Mais

Dissertation eingereicht am	18. Januar 2000
1. Gutachter:	Prof. Dr. C. Bräuchle
2. Gutachter:	Prof. Dr. M. Reichling
Mündliche Prüfung am	29. Februar 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen und Prinzipien der Einzelmolekülspektroskopie	6
2.1	Vorbemerkungen zur Absorption und Emission von Licht	6
2.1.1	Das Drei-Niveau-System für die optischen Übergänge eines Farbstoffmoleküls	7
2.1.2	Die homogene Linienform	9
2.1.3	Die Linienform im Festkörper	10
2.1.4	Die inhomogene Verbreiterung	13
2.1.5	Spektren	14
2.2	Spektrale Isolierung einzelner Moleküle mittels hochauflösender Spektroskopie bei tiefen Temperaturen	16
2.3	Räumliche Isolierung einzelner Moleküle mit mikroskopischen Techniken	18
2.3.1	Konfokale Mikroskopie und alternative Methoden	19
2.3.2	Laterale Auflösung	22
2.3.3	Räumliche Intensitätsverteilung	26
2.3.4	Axiale Auflösung im konfokalen Mikroskop	27
2.4	Anforderungen an die Systeme und die Apparatur zur Einzelmolekülspektroskopie	29
2.4.1	Fluoreszenzrate	29
2.4.2	Detektionseffizienz	31

2.4.3	Untergrund	34
2.5	Nachweis einzelner Moleküle	35
3	Theoretische Grundlagen	37
3.1	Stationäres Verhalten und Dynamik im Drei-Niveau-System	37
3.1.1	Ratengleichungen	37
3.1.2	Stationäre Lösung - das Sättigungsverhalten	39
3.1.3	Zeitabhängige Lösung - die Dynamik	41
3.1.4	Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität	43
3.2	Dynamische Einflüsse auf die homogene Linie	49
3.2.1	Das TLS-Modell	49
3.2.2	Spektrale Diffusion	51
3.2.3	Linienbreitenverteilungen	53
3.2.4	Temperaturabhängigkeit von Linienbreite und Linienposition	59
4	Experimenteller Aufbau	65
4.1	Das Lasersystem	66
4.1.1	Argon- und Farbstofflaser	66
4.1.2	Optische Resonatoren	68
4.1.3	Externe Stabilisierung	72
4.2	Optische Elemente im Anregungsstrahlengang	75
4.2.1	Glasfaser	76
4.2.2	Polarisationsdrehung	79
4.3	Der Linsen- und Faseraufbau	82
4.4	Das konfokale Laserscanning-Mikroskop	85
4.4.1	Überblick über die Apparatur	85
4.4.2	Laserscanning und telezentrisches System	87
4.4.3	Objektiv und Probenhalterung	89
4.4.4	Detektion	94

4.4.5	Steuerung und Datenverarbeitung	97
4.5	Probensysteme und ihre Präparation	98
5	Spektral hochauflösende Untersuchungen	102
5.1	Terrylendiimid - ein idealer Fluorophor bei 1,4 K und höheren Temperaturen	103
5.1.1	Spektrale Eigenschaften	103
5.1.2	Fluoreszenzanregungsspektren einzelner TDI-Moleküle	106
5.1.3	Sättigungsuntersuchungen an einzelnen TDI-Molekülen	108
5.1.4	Triplettraten einzelner TDI-Moleküle	110
5.1.5	Linienbreitenverteilungen	114
5.1.6	Temperaturabhängigkeit der Linienbreite und -form	118
5.2	Perylen-Terrylendiimid - Modellchromophor für Energietransfer-Untersuchungen	126
5.2.1	Grundlagen des elektronischen Energietransfers nach dem Förster-Mechanismus	127
5.2.2	Methoden zur Bestimmung der Energietransferrate	133
5.2.3	Spektrale Eigenschaften von Pe-TDI	134
5.2.4	Der Försterradius	137
5.2.5	Einzelmoleküldetektion	140
6	Mikroskopische Untersuchungen	146
6.1	Testpattern	146
6.2	Terrylen in Polyethylen als Testsystem bei tiefen Temperaturen	148
6.3	Terrylendiimid in Polymethylmethacrylat als Testsystem im gesamten Temperaturbereich	153
6.4	Einzelmoleküle als Sonden in beschränkter Geometrie	156
6.4.1	Terrylen in M41S	158
6.4.2	Pentacen in Perhydrotriphenylen	162
6.5	Einzelmolekülspektroskopie an biologischen Proben	166

6.5.1	Grün Fluoreszierendes Protein	167
6.5.2	Phycoerythrocyanin	175
7	Zusammenfassung	183
	Literaturverzeichnis	186

Kapitel 1

Einleitung

Die ersten überlieferten Gedanken an die kleinsten Bausteine der Materie von Leukippos (~ 450 v. Chr.) und Demokrit ($\sim 460 - 371$) sind fast 2500 Jahre alt und stammen aus der griechischen Antike [1]. Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts glaubten selbst renommierte Quantenphysiker wie E. Schrödinger nicht daran, jemals mit einzelnen Atomen oder Molekülen experimentieren zu können [2]. Mit der rasanten Entwicklung in Wissenschaft und Technik hin zur Herstellung immer kleinerer Strukturen wurden in den letzten Jahrzehnten jedoch experimentelle Methoden mit einer Auflösung bis hinab auf molekulare und atomare Ebene entwickelt.

Die Abbildung von Oberflächenstrukturen im Realraum mit einer Auflösung im Ångström-Bereich ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$) ist seit der Erfindung des Rastertunnel- [3, 4] und Rasterkraftmikroskops [5] an kristallinen Proben, aber auch an organischen Molekülen und biologischen Systemen, möglich [6, 7, 8]. Im Bereich optischer Spektroskopie ist die Speicherung einzelner Ionen in elektromagnetischen Fallen [9, 10] und damit das Studium grundlegender Quanteneffekte bei höchster Frequenzpräzision möglich. Die ersten Erfolge auf dem Gebiet der Einzelteilchendetektion reichen in die Mitte der 70er Jahre zurück, als einzelne Antikörper, die mit ca. 100 Farbstoffmolekülen markiert waren, beobachtet wurden [11]. Angeregt von der Steigerung der Sensitivität durch die Entwicklung hochempfindlicher Detektoren und den Fortschritten in der Lasertechnik hatten Wissenschaftler jedoch erst Ende der 80er Jahre die Idee und den Mut zur Spektroskopie von einzelnen, selektiv angeregten Farbstoffmolekülen.

Die stürmische Entwicklung in diesem Wissenschaftsbereich der Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle ist mit großem Informationsgewinn verbunden, der mit der Beobachtung der individuellen Moleküle einhergeht, und den erhöhten experimentellen Aufwand rechtfertigt. Es war erstmals die direkte Beobachtung

der Absorptionslinie und das zeitliche Verhalten der Fluoreszenzintensität einzelner Moleküle möglich. Zahlreiche Ereignisse wie auftretende Fluktuationen der Fluoreszenzintensität (An/Aus-Zustände der Fluoreszenz) von einem einzelnen Molekül können am Ensemble nicht beobachtet werden, da das Verhalten der einzelnen Moleküle im Ensemble nicht korreliert ist und individuelle Beiträge sich gegenüber der Summe der Beiträge der riesigen Anzahl anderer Moleküle nicht abheben. Bei anderen Messgrößen wie der Lebenszeit des angeregten Zustands oder der exakten Übergangsfrequenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand bieten Ensembleexperimente nur den Zugang zum Mittelwert über alle Moleküle. Untersuchungen an einzelnen Molekülen erlauben hingegen die Aufstellung der gesamten Verteilung der auftretenden, individuellen Werte.

Der Beginn der Einzelmolekülspektroskopie kann auf das Jahr 1989 datiert werden. In einer komplizierten Doppelmodulationstechnik zur Reduktion des Untergrunds gelang es Moerner und Kador, das Absorptionssignal eines einzelnen Moleküls im Festkörper bei kryogenen Temperaturen zu detektieren [12]. Dazu wurden Pentacen-Moleküle in geringer Konzentration in einen *para*-Terphenyl-Kristall eingelagert und durch ihre schmalen Absorptionslinien, die aufgrund der inhomogenen Verbreiterung über einen gewissen Frequenzbereich verteilt sind, spektral selektiv detektiert. Die Einführung der Fluoreszenzanregungsspektroskopie durch Orrit und Bernard [13] vereinfachte die Methode der Einzelmoleküldetektion, verhalf ihr damit zum Durchbruch und wird heute noch eingesetzt. Dabei wird ein spektral hochauflösender Laser um die spektral unterschiedlichen Übergangsfrequenzen der einzelnen Moleküle verstimmt und die Absorption der Moleküle über die Fluoreszenzemission detektiert.

Mit dieser Methode konnten seither viele Experimente zu quantenoptischen Effekten und viele spektroskopische Studien zur Untersuchung der lokalen Umgebung von Molekülen durchgeführt werden. Zu diesen Experimenten zählen die Beobachtung der spektralen Diffusion [14, 15, 16], des Sättigungsverhaltens und des temperaturabhängigen Phasenerfalls [17], des Lochbrennens am Einzelmolekül [18], des Stark-Effekts [19, 20], des hydrostatischen Druck-Effekts [21], des Photon-Antibunchings [22] und Photon-Bunchings [23] durch Fluoreszenzkorrelationspektroskopie, der magnetischen Resonanz eines einzelnen molekularen Spins [24, 25, 26, 27], der Quantensprünge [28], des dynamischen Stark-Effekts und nichtlinear-optischer Effekte [29, 30], der Zwei-Photonen-Absorption [31], des optischen Schaltens eines einzelnen Moleküls [32] und der unterschiedlichen Kopplungsmechanismen zwischen einzelnen Chlorophyll-Molekülen in einem Lichtsammelkomplex [33]. Das Gebiet der Tieftemperatur-spektroskopie an einzelnen Molekülen wurde immer wieder in Übersichtsartikeln [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40] und innerhalb von Artikelserien über Einzelmolekülspektroskopie [41, 42, 43] zusammengefasst .

Die Anzahl der Publikationen zu Tieftemperaturexperimenten mit *spektraler* Selektion einzelner Moleküle ging trotz ihrer hohen Informationsgehalte in den letzten drei Jahren zurück, da die Tieftemperatur-Einzelmolekülspektroskopie in dieser Form strenge Anforderungen bezüglich schmaler Absorptionslinien an die Chromophore stellt, die nur von einer sehr kleinen Gruppe von Farbstoffmolekülen erfüllt werden [34]. Dadurch schränkt sich das Kontingent an möglichen Experimenten ein.

Ergänzend zur Tieftemperaturspektroskopie entwickelte sich das Forschungsgebiet der Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle bei Raumtemperatur. Dabei darf sich im Anregungsvolumen nur ein einziges Molekül befinden, d.h. die spektrale Selektion bei Tieftemperatur wird durch eine *räumliche* Selektion ersetzt. Die erste Detektion eines einzelnen Moleküls bei Raumtemperatur gelang 1990 in wässriger Lösung [44]. Dabei stand das analytische Interesse, einzelne Moleküle meist in Flüssigkeiten und Flüssigkeitsströmen zu zählen und über ihre Lebenszeit und/oder über ihre Fluoreszenzfarbe zu identifizieren, im Mittelpunkt. Dies ist beispielsweise für Genomsequenzierung oder Virenerkennung nützlich [45, 46, 42, 47].

Zur Detektion immobilisierter Moleküle bei Raumtemperatur wurde zunächst die Technik der Nahfeldmikroskopie verwendet [48, 49, 50, 51, 52, 53], bei der eine Apertur deutlich kleiner als die Lichtwellenlänge in sehr geringem Abstand über die Probe gerastert wird und damit Strukturen unterhalb der Auflösungsgrenze des Lichts abgebildet werden können. Dadurch ließ sich zwar das Beleuchtungsvolumen reduzieren, man stellte jedoch bald fest, dass die spektroskopischen Eigenschaften der Moleküle durch die Nähe der metallisierten Spitze beeinflusst werden [50]. Bald darauf zeigte sich, dass das Ziel der Einzelmoleküldetektion leichter durch Fernfeld-Mikroskopie zu erreichen ist [54]. Die Abbildung kann dabei durch (konfokale) Rastermikroskopie [55] aus einzelnen Pixeln entstehen oder alle Bereiche des Bildes werden parallel durch direkte Abbildung gewonnen (*Imaging*) [56]. Die Anregung kann im zweiten Fall entweder direkt durch einen aufgeweiteten Laserstrahl erfolgen oder durch das evaneszente Feld einer inneren Totalreflexion [57]. Mit diesen Methoden konnten zahlreiche biologische Vorgänge beobachtet werden wie ATP-Umwandlung durch ein einzelnes Myosin-Molekül [57], die Bewegung des Motorproteins Kinesin [58], Diffusion in Lipidmembranen [59], optisches Schalten von Proteinen [60] und enzymatische Reaktionen [61]. Weitere Untersuchungen befassten sich mit spektralen Sprüngen [62], Diffusion in Gelen [63], Energietransfer zwischen zwei Farbstoffmolekülen [64] bzw. in einem konjugierten Polymer [65], Elektronentransfer [66], Fluoreszenzdynamik bei Polarisationsmodulation [67], eingeschränkter Diffusion [68], Lichtsammelkomplexen [70, 71] und anderen Themen [69, 41, 43].

In dieser Dissertation wurden zu Beginn spektral hochauflösende Experimente an dem neuen Farbstoffmolekül Terrylendiimid (TDI) durchgeführt. Unter Berücksich-

tigung bisheriger Erfahrungen wurde TDI als speziell optimiertes Molekül für die Einzelmolekülspektroskopie entwickelt. Neben hervorragenden photophysikalischen Eigenschaften zeigt es bei Tieftemperatur schmale Nullphononenlinien und ist nicht nur bei Tieftemperatur, sondern auch bei Raumtemperatur, sehr photostabil. Es wundert deshalb nicht, dass es als erster Farbstoff über den gesamten Temperaturbereich von 1,4 K bis Raumtemperatur untersucht und als Sonde eingesetzt werden konnte [72].

Tieftemperaturuntersuchungen und temperaturabhängige Messungen sind in Ergänzung zu Raumtemperaturexperimenten von großem Interesse, da sie das Einfrieren von dynamischen Prozessen und damit häufig eine einfachere und exaktere Charakterisierung der zu untersuchenden Phänomene erlauben. Tieftemperaturuntersuchungen unter Ausnutzung der bisher verwendeten *spektralen* Selektionstechnik sind jedoch, wie bereits erwähnt, auf einige wenige geeignete Systeme beschränkt, die die Möglichkeiten von neuen Experimenten einschränken. Durch *räumliche* Selektion einzelner Moleküle auch bei tiefen Temperaturen als Ersatz für *spektrale* Separation lassen sich die bestehenden Beschränkungen jedoch aufheben und beliebige, ausreichend fluoreszierende Chromophore spektroskopieren. Dazu wurde im Rahmen dieser Dissertation der vorhandene Aufbau in ein konfokales Laserscannig-Mikroskop umgebaut, mit dem Proben im Kryostaten bei beliebiger Temperatur unter Einzelmolekülauflösung untersucht werden können. Die strenge Einteilung und Unterscheidung zwischen Tief- und Raumtemperatur ist damit überflüssig und eine Vielzahl neuer Systeme werden für Einzelmoleküluntersuchungen unterhalb von Raumtemperatur zugänglich. Erste experimentelle Ergebnisse von Messungen an der neuen Apparatur an einerseits materialwissenschaftlich interessanten Proben und andererseits biologischen Systemen liegen bereits vor.

In Kapitel 2 werden zunächst die Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie dargestellt und ihre Voraussetzungen und Anforderungen diskutiert. Um die experimentellen Unterschiede zwischen der *spektralen* Separation und der *räumlichen* Isolierung einzelner Moleküle, sowie deren Auswirkungen auf die Wahl der Probenkonzentration und Anregungswellenlänge besser verstehen zu können, wird besonders auf die spektralen Eigenschaften von Farbstoffmolekülen bei verschiedenen Temperaturen eingegangen.

In Kapitel 3 werden die theoretischen Hintergründe zur Beschreibung der stationären und dynamischen Fluoreszenzeigenschaften von Farbstoffmolekülen vorgestellt. Außerdem werden Modelle zum Verständnis der Linienform erklärt, die in Tieftemperaturexperimenten eine wesentliche Messgröße ist, um damit charakteristische Eigenschaften der Matrix zu beschreiben, die das Sondenmolekül umgibt.

Das Kapitel 4 beschäftigt sich mit dem experimentellen Aufbau. Neben dem Lasersystem und den vorhandenen Aufbauten und Probensystemen wird besonders ausführlich auf die Funktion des im Rahmen dieser Dissertation aufgebauten Laserscanning-Mikroskops eingegangen. Weiter wird eine externe, aktive Frequenzstabilisierung des Farbstofflasers, die in der Anfangsphase dieser Doktorarbeit entstand und die die Möglichkeit stabiler Frequenzscans bietet, beschrieben.

Die Ergebnisse aus den Tieftemperaturuntersuchungen mit spektraler Selektion werden in Kapitel 5 behandelt. Dabei sind alle Experimente an Terrylendiimid (TDI) zusammengestellt. Im Einzelnen sind es die Untersuchungen des Sättigungsverhaltens, die Bestimmung der Triplettraten durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, die Detektion von Emissionsspektren einzelner Moleküle, sowie die Untersuchung von Linienbreitenverteilungen und der Temperaturabhängigkeit der Linienform zur Charakterisierung der verwendeten Matrizen Polyethylen und Hexadecan. Zusätzlich zu den Experimenten an TDI wurden auch Untersuchungen zum Energietransfer bei Tieftemperatur am neuen Bichromophor Perylen-TDI durchgeführt. Neben der Darstellung der Ergebnisse findet sich in Kapitel 5 auch eine Beschreibung der Theorie zum Energietransfer nach dem Förster-Mechanismus.

In Kapitel 6 werden die ersten Experimente am neu aufgebauten Tieftemperatur-Mikroskop beschrieben. Nach den Charakterisierungsuntersuchungen an Testpattern und bekannten Probensystemen im gesamten Temperaturbereich werden Experimente in zwei neuen Gebieten vorgestellt: die Untersuchung einzelner Moleküle in Porensystemen und die Untersuchung einzelner Proteine am Beispiel des Grün Fluoreszierenden Proteins und der Phycoerythrocyanine aus dem Lichtsammelkomplex von Cyanobakterien.

Ein Überblick in Kapitel 7 über alle in dieser Dissertation durchgeführten Experimente und die dabei erzielten Ergebnisse beschließt diese Arbeit.

Kapitel 2

Grundlagen und Prinzipien der Einzelmolekülspektroskopie

In konventionellen optischen Spektroskopiemethoden wie UV/VIS-, Infrarot- oder Ramanspektroskopie untersucht man eine sehr große Anzahl von Molekülen, typischerweise in der Größenordnung von 10^{15} Teilchen. Um aus dieser riesigen Anzahl ein einzelnes Molekül selektiv zu adressieren, müssen die Proben stark verdünnt und geeignete Techniken zur Isolierung einzelner Moleküle angewendet werden. Zwei unterschiedlichen Methoden, die zu diesem Ziel führen, werden im zweiten und dritten Teil dieses Kapitels dargestellt. Um die beiden Techniken besser verstehen zu können, wird im ersten Teil dieses Kapitels zunächst ein kurzer Überblick über die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Farbstoffen in Festkörpern, von denen im Folgenden die Rede sein wird, bei verschiedenen Temperaturen gegeben. In den anderen beiden Teilen dieses Kapitels werden die Anforderungen diskutiert, die nötig sind, um ein einzelnes Molekül über sein Fluoreszenzsignal zu detektieren, und die Belege genannt, die zeigen, dass das detektierte Signal tatsächlich von einzelnen Molekülen stammt.

2.1 Vorbemerkungen zur Absorption und Emission von Licht

Bei allen hier vorgestellten Techniken werden die Moleküle ausschließlich über ihr Fluoreszenzsignal detektiert. Daraus wird eine Vielzahl von Informationen zugänglich, die Rückschlüsse auf die molekularen Eigenschaften erlauben.

2.1.1 Das Drei-Niveau-System für die optischen Übergänge eines Farbstoffmoleküls

Alle wesentlichen Übergänge, die in einem Farbstoffmolekül stattfinden, und damit dessen Absorptions- und Emissionseigenschaften, können in einem Drei-Niveau-System dargestellt werden. Zumeist befindet sich das Farbstoffmolekül im elektronischen Grundzustand (Singulett S_0). Durch Lichteinstrahlung lässt es sich in einen elektronisch angeregten Zustand S_1 überführen. Auf die Darstellung höherer elektronischer Anregungszustände S_n wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Sie gewinnen erst bei Mehr-Photonen-Prozessen an Bedeutung.

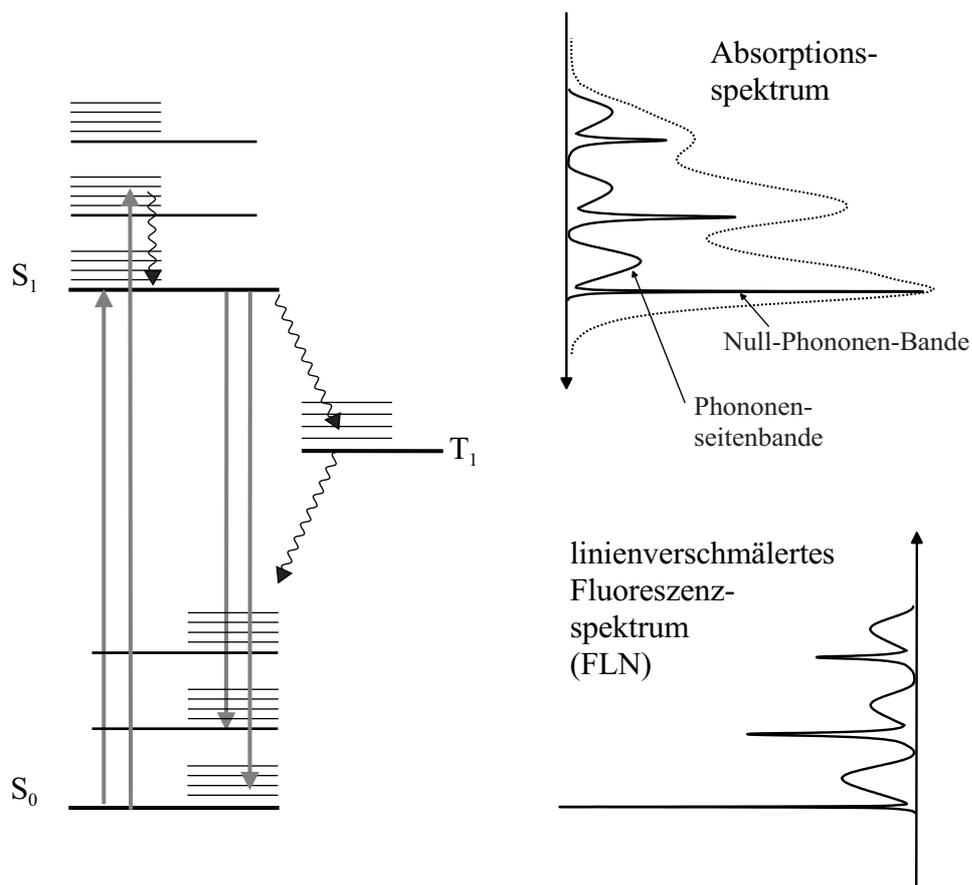


Abbildung 2.1: Jablonski-Termschema für ein Farbstoffmolekül mit drei Niveaus. Neben elektronischen Niveaus sind Schwingungsniveaus und phononische Zustände eingezeichnet. Zusätzlich sind die auftretenden Spektren dargestellt, die im Text näher erläutert werden.

Der energetische Abstand der beiden Niveaus S_0 und S_1 ist durch die Vakuumübergangsfrequenz der Moleküle wiedergegeben. Wechselwirkungen der Moleküle mit ihrer speziellen Umgebung führen zu einer Verschiebung der Übergangsfrequenzen

(*solvent shift*), die von Molekül zu Molekül unterschiedlich sein kann und eine inhomogene Verbreiterung in Ensemblespektren zur Folge hat.

Ein Übergang kann in den Schwingungsgrundzustand von S_1 oder in ein Schwingungsniveau von S_1 erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit der einzelnen Übergänge wird durch deren Franck-Condon-Faktoren bestimmt, die den Überlapp der Schwingungswellenfunktionen in S_0 und S_1 widerspiegeln. Die Energieunterschiede der Schwingungsniveaus liegen in der Größenordnung von $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Selbst bei Raumtemperatur ($kT/hc \cong 200 \text{ cm}^{-1}$) sind höhere Schwingungszustände deshalb thermisch kaum populiert. Schwingungsanregung im elektronisch angeregten Zustand S_1 zerfällt innerhalb von Pikosekunden strahlungslos in dessen Schwingungsgrundzustand. Bei Molekülen, die in einen Festkörper eingelagert sind, können außerdem noch Kombinationsübergänge auftreten, bei denen neben dem Chromophor auch Phononen der Matrix angeregt werden. Die Energiedifferenzen dieser Zustände liegen typischerweise zwischen 20 und 200 cm^{-1} und führen bei Raumtemperatur zu einer Verbreiterung des homogenen Spektrums. Die Auswirkungen von Phononanregungen bei tiefen Temperaturen hängen von der Kopplung des elektronischen Systems an die Umgebung ab, der sogenannten *Elektron-Phonon-Kopplung*. Diese wird im übernächsten Abschnitt näher erläutert.

Wenige Pikosekunden nach der Anregung befindet sich das Farbstoffmolekül im Schwingungsgrundzustand von S_1 . Hier tritt nun normalerweise Fluoreszenz auf, d.h. das Molekül geht vom elektronisch angeregten Zustand S_1 wieder in den elektronischen Grundzustand S_0 über und sendet dabei ein Photon aus. Das Fluoreszenzlicht ist meist rotverschoben zum Anregungslicht, da wie bei der Anregung ein höherer Schwingungszustand besetzt werden kann. Die Lebenszeit des elektronisch angeregten Zustands S_1 beträgt einige Nanosekunden, was einer Fluoreszenzrate von 10^8 pro Sekunde entspricht. Neben dem fluoreszierenden Übergang können auch andere, strahlungslose Übergänge auftreten. Dazu zählen die Relaxation in den Grundzustand durch interne Konversion (strahlungslos, in Abb. 2.1 nicht eingezeichnet) oder der Übergang in einen Triplettzustand (*intersystem crossing*). Letzterer ist wegen der Spinumkehr eigentlich verboten, tritt aufgrund von Spin-Bahn-Kopplung jedoch mit einer geringen Wahrscheinlichkeit auf. Da auch die Rückkehr in das Singulettssystem spinverboten ist, hat dieser Zustand eine relativ lange Lebenszeit im Bereich von Mikrosekunden bis Sekunden. Während dieser Zeit ist das Molekül einer Anregung im elektronischen Grundzustand S_0 entzogen, so dass keine Fluoreszenz beobachtet werden kann. Die Entvölkerung des Triplettzustands erfolgt für Systeme, die in der Einzelmolekülspektroskopie eine Rolle spielen, meist strahlungslos und nicht unter Emission eines Photons (Phosphoreszenz).

2.1.2 Die homogene Linienform

Die Linienbreite eines optischen Dipolübergangs ist aufgrund der Heisenbergschen Unschärferelation nicht beliebig klein, sondern durch die endliche Lebensdauer T_1 des angeregten Zustandes beschränkt. In einem rein klassischen Ansatz kann die Emission der Übergangsenergie durch die Abstrahlung eines elektrischen Dipols beschrieben werden, der mit der Frequenz des Übergangs ω_0 oszilliert. Die Amplitude der Oszillation des Übergangsdipols ist durch den Energieverlust der Abstrahlung gedämpft. Die zeitlich gedämpfte Schwingung lässt sich nur noch als Summe von Schwingungen verschiedener Frequenzen um ω_0 darstellen. Man erhält die Verteilung dieser Frequenzen, also das Spektrum, durch Fouriertransformation der zeitlich gedämpften Schwingung. Im Falle eines Übergangs zwischen einem angeregten Zustand mit der Lebenszeit T_1 und einem stabilen Grundzustand ohne weitere Störungen ist der Dämpfungsterm $e^{-1/(2T_1)}$ (der Faktor $\frac{1}{2}$ im Exponenten tritt auf, da die Amplitude im positiven und negativen Bereich gedämpft wird) und das Profil lorentzförmig entsprechend $I(\omega) = \frac{\frac{1}{T_1}}{(\omega - \omega_0)^2 + (\frac{1}{2T_1})^2}$. Unter Verwendung der einfachen Frequenzeinheiten ν und der Halbwertsbreite (*full width at half maximum*) der Linie $\Delta\nu_{hb}$ lässt sich die auf die Fläche 1 normierte Lorentzfunktion allgemein schreiben als:

$$I(\nu) = \frac{1}{2\pi} \frac{\Delta\nu_{hb}}{(\nu - \nu_0)^2 + (\frac{\Delta\nu_{hb}}{2})^2} \quad (2.1)$$

Dabei ist ν die Frequenz des anregenden Lasers und ν_0 die Frequenz des molekularen Übergangs. In Abb. 2.2 ist ein entsprechendes Profil im Vergleich mit einem Gaußprofil dargestellt. Sie zeigt, dass die Lorentzkurve sehr viel langsamer gegen Null hin abfällt. Da das Signal in der Praxis immer von Untergrund überlagert ist, benötigt man zur Anpassung einer Fitkurve immer Daten über einen Bereich von mindestens der zehnfachen Halbwertsbreite.

Die minimale Halbwertsbreite ist gegeben durch die mittlere Lebensdauer T_1 des angeregten Zustands (auch longitudinale Relaxationszeit) mit $\Delta\nu_{hb_0} = \frac{1}{2\pi T_1}$. Durch Fluktuationen der Übergangsenergie aufgrund von Wechselwirkungen des Chromophors mit niederfrequenten Anregungszuständen der Matrix (Phononen) kann die Linie aber auch verbreitert werden. Nach der Theorie von Kubo [73] bleibt sie dabei lorentzförmig. Die Verbreiterung wird durch eine zweite Zeitkonstante, die reine Phasenrelaxationszeit T_2^* (auch transversale Relaxationszeit) beschrieben. Bei sehr tiefen Temperaturen wird diese Zeit jedoch sehr groß und ihr Beitrag vernachlässigbar. Im Gegensatz zu T_1 ist T_2^* stark temperaturabhängig und führt schon bei geringer Erwärmung zu einer Linienverbreiterung. Da diese Beiträge im Mittel für alle

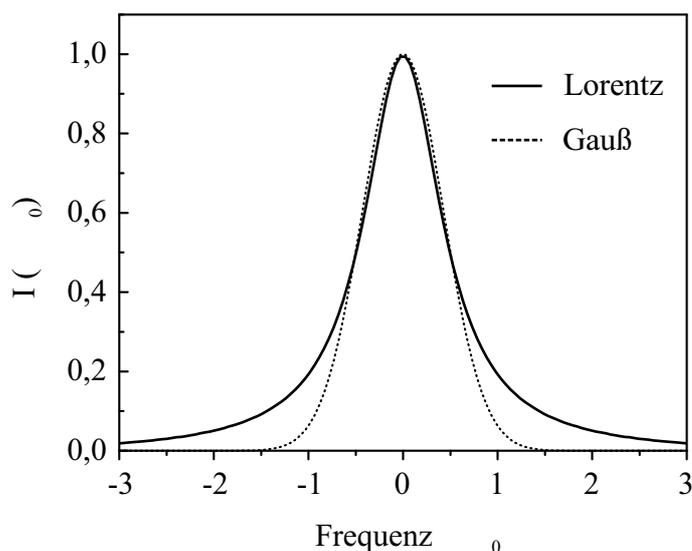


Abbildung 2.2: Das Lorentz- und Gaußprofil im Vergleich. Beide Kurven sind auf eine Amplitude von 1 normiert und haben eine Halbwertsbreite von 1.

Moleküle gleich sind, bezeichnet man sie als homogen. Als homogene Linienbreite ergibt sich damit:

$$\Delta\nu_{hb} = \frac{1}{2\pi T_1} + \frac{1}{\pi T_2^*} \quad (2.2)$$

Durch Unordnung in der Matrix kann es zu weiteren Linienverbreiterungen kommen. Diese sind jedoch nicht mehr notwendigerweise für alle Chromophore identisch, da jedes Molekül seine individuelle, unterschiedliche Umgebung hat. Die Linienbreite kann strenggenommen deshalb auch nicht mehr als homogen bezeichnet werden. Dieser Effekt und ein weiterer Verbreiterungsmechanismus, die Sättigungsverbreiterung, werden im nächsten Kapitel behandelt.

2.1.3 Die Linienform im Festkörper

Im letzten Abschnitt wurde die Ankopplung elektronischer Übergänge eines Moleküls an Phononen des umgebenden Festkörpers nicht in Betracht gezogen. Die bisher beschriebene homogene Linie stellt deshalb nur einen Teil des auftretenden Spektrums, die Nullphononenlinie (*zero phonon line*, ZPL), dar. Sie ist das Analogon zur Mößbauer-Linie bei der rückstoßfreien Emission von γ -Quanten. Die Berücksichtigung der Phononenbeteiligung am Übergang im Rahmen der linearen Elektron-Phonon-Kopplung führt zum Auftreten von einer Phononenseitenbande

(PSB), die in Absorption blau verschoben zur ZPL und in Fluoreszenz rot verschoben zur ZPL beobachtet wird [74]. Die einzelnen Beiträge der unterschiedlichen Phononenübergänge überlappen dabei zu einer breiten Bande, da die Linienbreiten aufgrund der kurzen Lebenszeiten größer sind als ihr Abstand.

Bei Raumtemperatur sind so viele Phononen der Wirtsmatrix im elektronischen Grundzustand thermisch aktiviert, dass die Nullphononenlinie unter der breiten Phononenseitenbande von oft mehreren tausend GHz (einige nm) verschwindet. Deshalb beschränkt sich die weitere Diskussion auf tiefe Temperaturen. In diesem Fall sind keine Gitterschwingungen im Grundzustand angeregt und die ZPL stellt in der Absorption den niederenergetischsten Übergang dar.

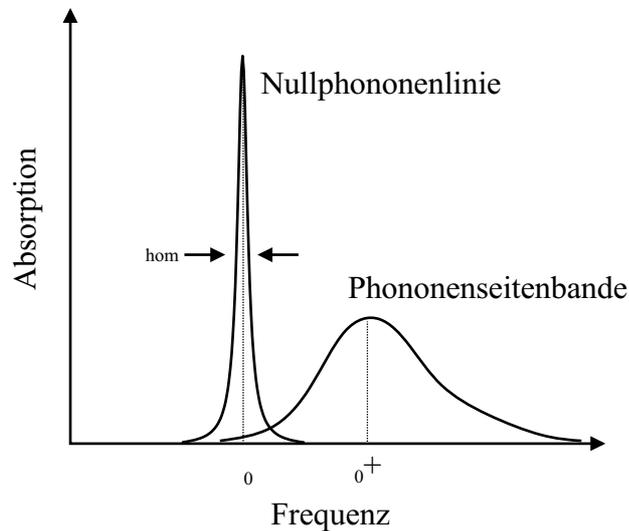


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Linienform für die Absorption eines Dotierungsmoleküls im Festkörper bei tiefen Temperaturen.

Der genauere Hintergrund soll hier nur angedeutet werden und ist in [75] detailliert beschrieben. Mit Hilfe eines Konfigurationskoordinatenmodells lassen sich die Potentialkurven der elektronischen Zustände, gekoppelt an Schwingungen der Wirtsmatrix, als parabelförmige, harmonische Potentiale darstellen (siehe Abb. 2.4). Übergänge treten aus der Gleichgewichtslage q_0 des Grundzustands gemäß dem Franck-Condon-Prinzip auf. Dieses besagt, dass die elektronischen Übergänge viel schneller stattfinden als die Atomkerne des Moleküls und seiner Umgebung in eine neue Gleichgewichtslage folgen können. Die durch die geänderte Ladungsverteilung im angeregten Zustand verschobene Gleichgewichtskoordinate q_1 führt zu einer zunehmenden Wahrscheinlichkeit der Anregung von Phononen. Die theoretische Beschreibung startet von der Differenz der potentiellen Energien ΔV [76, 77]:

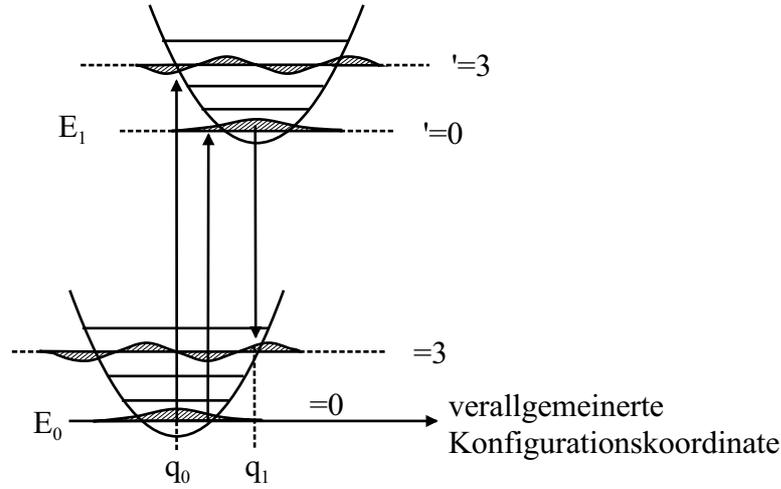


Abbildung 2.4: Potentialschema zur Erklärung des Auftretens der Phononenseitenbande. Übergänge finden gemäß dem Franck-Condon-Prinzip senkrecht statt, ihre Stärke folgt aus dem Überlapp der gemischten Wellenfunktionen.

$$\Delta V = \hbar\omega_0 + \sum_i a_i\phi_i + \frac{1}{2} \sum_i W_i\phi_i^2 \quad (2.3)$$

Der erste Term entspricht dem rein elektronischen Übergang. Der zweite Term mit dem Kopplungsparameter a_i gibt die lineare Elektron-Phonon-Kopplung wieder und führt zu der eben diskutierten Phononenseitenbande. Der dritte Term mit Kopplungsparameter W_i berücksichtigt die quadratische Elektron-Phonon-Kopplung. Diese ist verantwortlich für eine temperaturabhängige Verbreiterung der Nullphononenlinie, die im dritten Kapitel behandelt wird.

Um möglichst scharfe Spektren und hohe spektrale Auflösung zu erhalten, ist es von Interesse, die Elektron-Phonon-Kopplung zu unterdrücken. Dann fällt die meiste Intensität in die ZPL, die aufgrund ihrer Schärfe entsprechend intensiv wird. Die Linienbreite der ZPL von Probensystemen, die in der Tieftemperatur-Einzelmolekülspektroskopie verwendet werden, liegt bei einigen zehn MHz ($\cong 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$), während die Phononenseitenbande einige zehn cm^{-1} breit und entsprechend flach ist. Ein Maß für die Stärke der Kopplung ist der Debye-Waller-Faktor, der als Verhältnis der integralen Intensität des Nullphononenübergangs I_{ZPL} zur gesamten Intensität ($I_{ZPL} + I_{PSB}$) gegeben ist:

$$\alpha_D = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PSB}} \quad (2.4)$$

Bei schwacher Kopplung nähert sich der Debye-Waller-Faktor 1 an, nimmt bei Erhöhung der Temperatur aber schnell ab und strebt gegen 0.

2.1.4 Die inhomogene Verbreiterung

Neben den dynamischen Effekten beeinflussen auch statische und quasistatische Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle mit dem sie umschließenden Festkörper deren Absorptionslinien. Verspannungen, Defekte und daraus resultierende elektromagnetische Felder führen zu unterschiedlichen Umgebungen der Chromophore und damit zu unterschiedlichen Absorptionsfrequenzen.

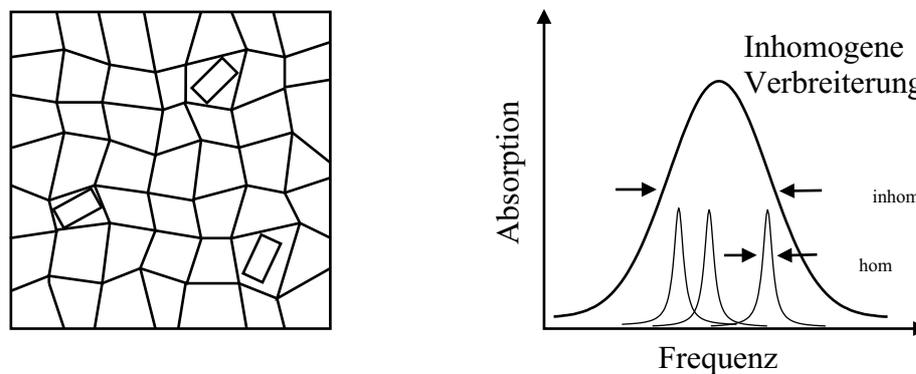


Abbildung 2.5: Die Einlagerung von Farbstoffen in Festkörper führt durch die unterschiedlichen Umgebungen zu verschiedenen Absorptionsfrequenzen der individuellen Chromophore und damit zur inhomogenen Verbreiterung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Phononenseitenbanden weggelassen.

In der Natur treten keine idealen Kristalle auf, in denen alle Dotierungsmoleküle die identische Absorptionsfrequenz besäßen. In realen Kristallen werden statt dessen inhomogene Linienbreiten von 1 bis 100 GHz beobachtet. In amorphen Festkörpern wie Polymeren und Gläsern führt die stärkere Unordnung sogar zu Verbreiterungen über 1000 GHz (einige nm). Bei Raumtemperatur ist die inhomogene Verbreiterung von untergeordneter Bedeutung, da die homogene Linienbreite meist in derselben Größenordnung ist (bei kristallinen Systemen sogar oft deutlich größer). Bei tiefer Temperatur, bei der homogene Linienbreiten kleiner als 100 MHz auftreten können, können mit Techniken wie spektralem Lochbrennen [78] und Fluoreszenzlinienverschmälerung (*fluorescence line narrowing*, FLN) [79, 80] Subensembles aus der inhomogenen Verbreiterung selektiert werden (siehe nächster Abschnitt). Im Extremfall gelingt mit ähnlichen Techniken die Separation einzelner Moleküle bei Tieftemperatur.

2.1.5 Spektren

Nachdem nun alle grundlegenden Informationen über die auftretenden Übergänge bei Tief- und Raumtemperatur dargelegt sind, soll eine kurze Diskussion der für diese Arbeit wichtigen Arten von Spektren folgen. Dabei handelt es sich um Absorptions-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren.

Bei Absorptionsspektren wird in Abhängigkeit der Wellenlänge die Abnahme der eingestrahnten Intensität durch Absorption der Probe relativ zu einem ungestörten Referenzstrahl detektiert. Als Anregungslichtquelle werden meist Lampen (z.B. Quecksilber- oder Xenonlampen) verwendet, die die Aufnahme von Spektren über den gesamten sichtbaren Spektralbereich bis ins UV erlauben. Für diese Arbeit wurden nur Absorptionsspektren von Farbstofflösungen aufgenommen, um deren Konzentrationen über das Lambert-Beersche Gesetz zu bestimmen. Im Hinblick auf Einzelmoleküldetektion hat sich die Absorptionstechnik nicht durchgesetzt, da die geringe Intensitätsänderung durch ein einzelnes Farbstoffmolekül selbst mit komplizierten Modulationsmethoden nur sehr schwer detektierbar ist [12, 81]. Diese Methode hat zwar den Vorteil, unabhängig von der Fluoreszenzquantenausbeute zu sein, gelang bisher aber nur an den Standardsystemen der Einzelmolekülspektroskopie bei Tieftemperatur [82].

Eine weitere Technik, die Aussagen über das Absorptionsverhalten einer fluoreszierenden Probe zulässt, ist die Fluoreszenzanregungsspektroskopie. Dabei wird die Gesamtfluoreszenz in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge bestimmt. Bei den Wellenlängen, an denen der Farbstoff absorbiert, erhält man ein Fluoreszenzsignal, so dass die Spektren meist analog zu Absorptionsspektren sind, die Chromophore aber fluoreszieren müssen. Treten Prozesse wie Energietransfer auf, können sich Anregungsspektren jedoch auch von Absorptionsspektren in ihren Intensitätsverhältnissen unterscheiden. Ein Nachteil von Anregungsspektren ist, dass man oftmals einen großen Teil des Fluoreszenzsignals verliert, da man es mit dem Anregungsstreulicht spektral abblocken muss.

Bei Raumtemperatur bestehen Anregungsspektren meist aus einer breiten Bande, die gegebenenfalls noch kurzweilige Nebenmaxima aufgrund von intensiven Molekülschwingungen aufweisen. Erniedrigt man die Temperatur und damit die homogene Linienbreite, so verändert sich das Anregungsspektrum äußerlich nur, wenn die inhomogene Verbreiterung deutlich geringer ist als die homogene, also bei geordneten (kristallinen) Systemen. Das Spektrum zeigt dann scharfe Banden, die bestimmten Einbaulagen (*sites*) zugeordnet werden können.

Durch schmalbandige Anregung kann aber auch in einem ungeordneten System eine bestimmte Klasse von Molekülen selektiert werden, und zwar jene, deren Ein-

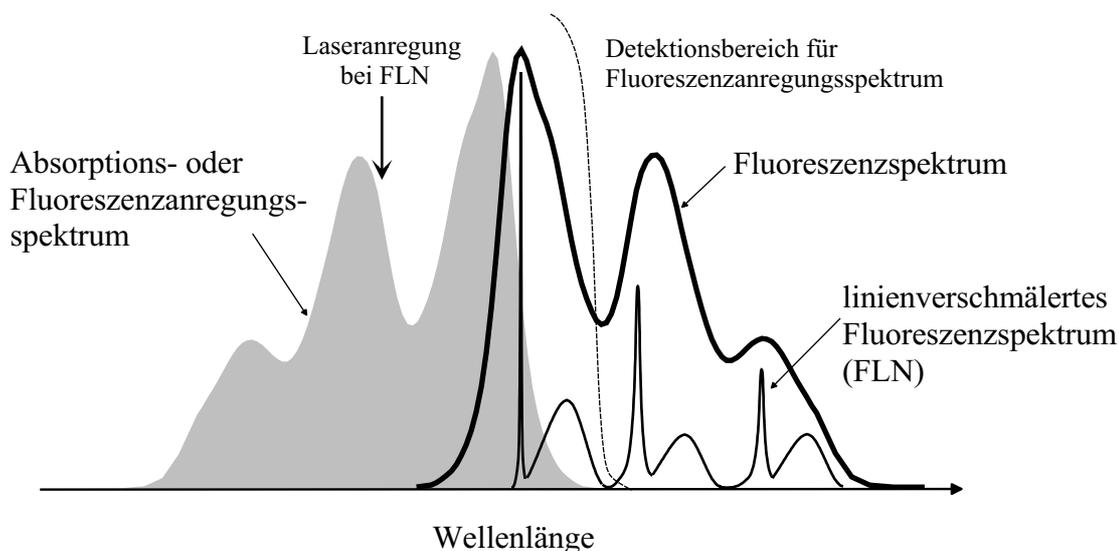


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung von einem Absorptions- bzw. Fluoreszenzanregungsspektrum, sowie von Fluoreszenzspektren. Die Fluoreszenzlinienverschmälung tritt nur bei tiefen Temperaturen und siteselektiver Anregung mit einem schmalbandigen Laser auf.

baulage zu einer Absorptionsfrequenz führt, die resonant zum eingestrahlt Laserlicht ist. Durch das Durchlaufen zahlreicher Anregungszyklen wird Energie an die diese Moleküle umgebende Matrix abgegeben. Dies kann zu einer Änderung der Molekülumgebungen führen, die mit einem Wechsel der Absorptionsfrequenz der Moleküle verbunden ist. Im Fluoreszenzanregungsspektrum fehlen nun die Beiträge von Molekülen dieser Frequenz und es entsteht ein spektrales Loch in der Bande mit der doppelten homogenen Linienbreite. Diese Methode zur Überwindung der inhomogenen Verbreiterung ist das zuvor schon erwähnte photophysikalische, spektrale Lochbrennen. Führt die Einstrahlung zu einer chemischen Reaktion der Moleküle und damit ebenfalls zu einem Wechsel der Absorptionsfrequenz bzw. zum Bleichen der Farbstoffe, spricht man von photochemischem Lochbrennen.

Interessiert man sich nicht für die Wellenlängenabhängigkeit in der Absorption, sondern in der Emission, nimmt man Fluoreszenzspektren auf. Dabei wird die Probe in einen vibronischen Zustand angeregt und das Fluoreszenzsignal mit einem Gitter oder Prisma dispergiert. Bei Raumtemperatur gleichen Fluoreszenzspektren den gespiegelten Absorptions- oder Anregungsspektren, was sich mit Hilfe von Abb. 2.1 leicht verstehen lässt. Die Wellenlänge des rein elektronischen Übergangs sind durch den Stokes-Shift, also die Absenkung der Anregungsenergie durch Relaxation der Kerne in ihre neue Gleichgewichtslage, leicht rot verschoben.

Bei tiefen Temperaturen kann man wieder die inhomogene Verbreiterung überwin-

den, wenn man schmalbandig mit einem Laser nur Moleküle einer ausgewählten Klasse anregt, deren Schwingungs- oder Phononenbanden dem Übergang bei der gewählten Laserfrequenz entsprechen. Dabei kann es zwar noch zur Überlagerung verschiedener Subensembles kommen, die in verschiedene Schwingungsmoden angeregt werden, eine Linienverschmälerung tritt jedoch in jedem Fall auf. Im Spektrum sind dann als kurzweiligster Peak der 0-0-Übergang zu beobachten, sowie die erlaubten Schwingungsübergänge in ihrem energetischen Abstand zur 0-0-Linie. Außerdem treten Phononenseitenbanden auf der langwelligen Seite jedes Peaks auf. Die Breite, insbesondere des 0-0-Peaks, aber meist auch der Schwingungspeaks, ist bei Fluoreszenzspektren meist schmäler als die typische Auflösung von einigen Wellenzahlen (~ 100 GHz) der verwendeten Geräte (Monochromator, Spektrograph).

Eine weitere Methode zur Überwindung der inhomogenen Verbreiterung ist die Spektroskopie einzelner Moleküle. Man unterscheidet zwei prinzipielle Techniken, die es erlauben, nur ein einzelnes Molekül anzuregen. Sie werden im Folgenden erläutert.

2.2 Spektrale Isolierung einzelner Moleküle mittels hochauflösender Spektroskopie bei tiefen Temperaturen

Um mit dieser Technik die Wechselwirkung mit nur einem Farbstoffmolekül zu erreichen, ist es notwendig, die Konzentration der Chromophore im Festkörper stark zu reduzieren, sowie das Anregungsvolumen möglichst klein zu wählen. Außerdem müssen die Farbstoffe scharfe Absorptionslinien zeigen und schmalbandig angeregt werden.

Bei tiefen Temperaturen zeigt eine gewisse Klasse von Farbstoff-Matrix-Systemen derartig schmale Nullphononenlinien, dass eine Verringerung der Anzahl der Farbstoffmoleküle im Probenvolumen von der inhomogenen Absorptionsbande zu einer Bande mit Feinstruktur führt [83]. Dabei handelt es sich um reproduzierbare Spektren, die aufgrund der geringeren Molekülzahl und deren statistischer Verteilung im Frequenzraum nicht mehr so glatt sind wie im Falle der Mittelung über eine große Anzahl an Absorbern. Wie die Simulation in Abb. 2.7 veranschaulicht, führt eine weitere Reduzierung der Chromophor-Konzentration zu separierten Absorptionslinien einzelner Moleküle bei unterschiedlichen Frequenzen. Man nutzt dabei die unterschiedlichen Umgebungen der individuellen Moleküle und die daraus folgenden unterschiedlichen Absorptionsfrequenzen zur spektralen Isolierung der einzelnen Moleküle. Typische Konzentrationen für Polymerproben sind 10^{-8} M bei Proben-

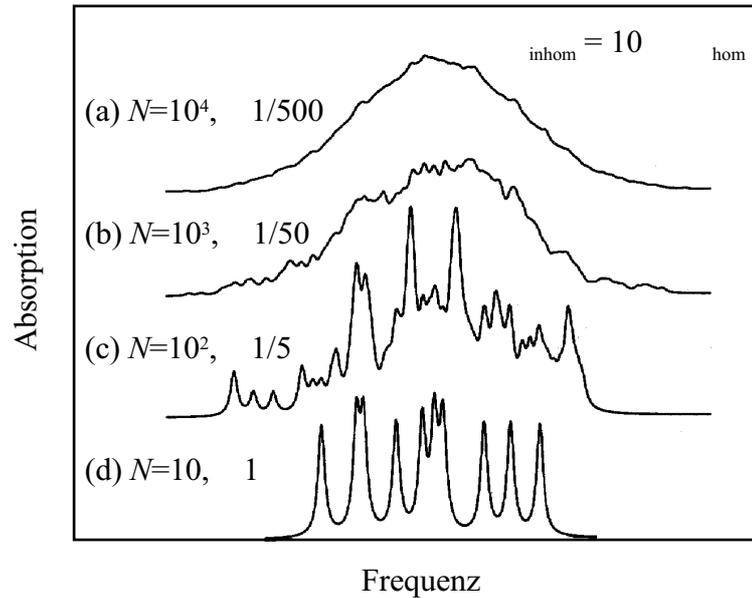


Abbildung 2.7: (a-d) Simulation von Absorptionsspektren mit abnehmender Zahl an Absorbieren. Mit abnehmender Konzentration zeigt sich zunächst die statistische Feinstruktur und bei sehr niedrigen Konzentrationen die Absorptionslinien von einzelnen Molekülen. Die Mittenfrequenzen wurden als gaußförmig angenommen (nach [40]).

dimensionen im μm -Bereich. Das entspricht einer Molekülnzahl von einigen Tausend im beleuchteten Volumen von einigen zehn Femtolitern. Die Anzahl N der spektral trennbaren Einzelmoleküle im Anregungsvolumen ist bei dieser Selektionsmethode durch das Verhältnis von inhomogener zu homogener Linienbreite nach oben beschränkt: $N < \frac{\Delta\nu_{inhom}}{\Delta\nu_{hom}}$.

Die experimentelle Realisation gelingt durch Aufnahme eines Fluoreszenzanregungsspektrums mit einem schmalbandigen Farbstofflaser, dessen Linienbreite mit < 1 MHz schmäler als die homogene Linie der Chromophore ist, die ihrerseits extrem scharf sein muss. Es eignet sich nur die Nullphononenlinie des rein elektronischen Übergangs (0-0-Übergang), denn die Anregung in einen Schwingungszustand zeigt wegen dessen kurzer Lebenszeit eine etwa 1000-fach breitere Linie mit entsprechend geringer Intensität. Analoges gilt für die Phononenseitenbanden. Durch die Schärfe der Nullphononenlinie ergibt sich eine stark erhöhte Absorption. Allerdings hat die Anregung bei der langwelligsten Absorption auch zur Folge, dass ein Großteil der Einzelmolekülfluoreszenz im Wellenlängenbereich des Anregungslichts auftritt, spektral geblockt werden muss und nicht detektiert werden kann.

Die erste Detektion einzelner, spektral separierter Moleküle über Fluoreszenzanregung gelang 1990 [13]. Seitdem ist die Anzahl an Farbstoff-Matrix-Systemen zwar

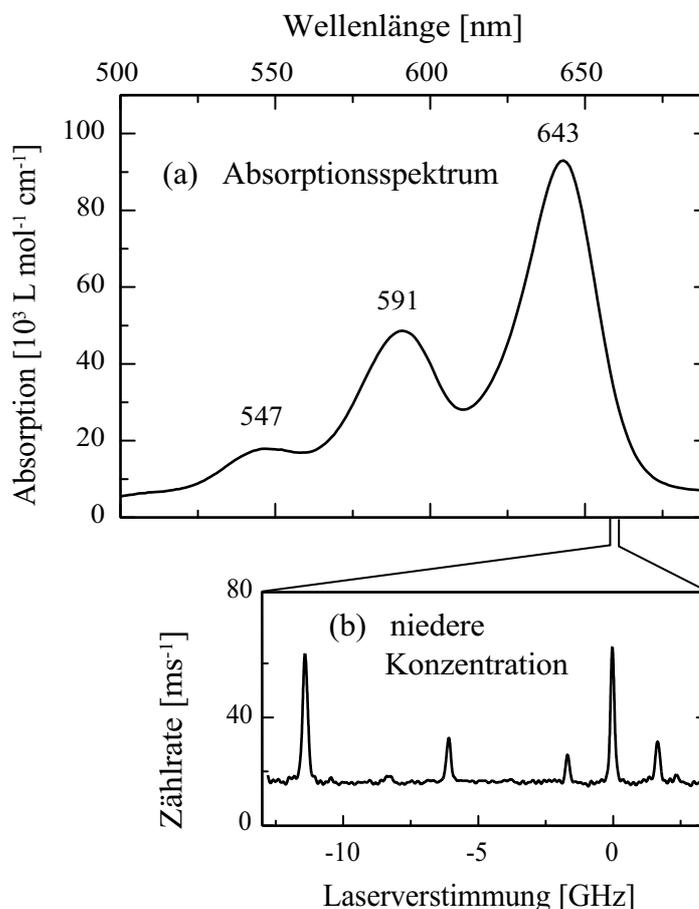


Abbildung 2.8: Terrylendiimid in Hexadecan: (a) Absorptionsspektrum einer hoch konzentrierten Probe bei Raumtemperatur und (b) Fluoreszenzanregungsspektrum einer niedrig konzentrierten Probe bei 1,4 K, aufgenommen in der roten Flanke bei 659 nm.

größer geworden, insgesamt hat sich jedoch gezeigt, dass die Forderung nach schmalen Nullphononenlinien eine starke Einschränkung bei der Auswahl geeigneter Systeme ist. Neben dieser speziellen Anforderung treten weitere Anforderungen wie hohe Fluoreszenzzählrate, geringer Streuuntergrund und geringe Lochbrenneffizienz, die im Kapitel 2.4 näher behandelt werden.

2.3 Räumliche Isolierung einzelner Moleküle mit mikroskopischen Techniken

Eine weitere Technik zur Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle ist ihre räumliche Isolierung. Im Gegensatz zur im letzten Kapitel vorgestellten (spektralen) Se-

paration im Frequenzraum werden die Moleküle hier im Realraum separiert. Dies erfordert eine noch stärkeren Verdünnung der Proben, so dass im Mittel nur 1 Farbstoffmolekül im Anregungs- bzw. Abbildungsvolumen ist. Der Anregungsstrahl wird dazu bestmöglich fokussiert und die Konzentration der Proben entsprechend erniedrigt. Diese Methode stellt keine speziellen spektralen Anforderungen an das Molekül, insbesondere erfordert sie keine schmalen Absorptionslinien, und ist deshalb bei beliebiger Temperatur durchführbar. Die Farbstoffe werden in eine Schwingungsbande angeregt und ihre Gesamtfluoreszenz detektiert. Obwohl diese Methode eigentlich sehr naheliegend erscheint, wurden die ersten Experimente an räumlich separierten Einzelmolekülen erst durchgeführt, nachdem die Einzelmoleküldetektion in spektral separierenden Tieftemperaturexperimenten gelang.

2.3.1 Konfokale Mikroskopie und alternative Methoden

Aufgrund seiner Beugungseigenschaften kann Licht nicht auf einen Durchmesser fokussiert werden, der der tatsächlichen räumlichen Ausdehnung von Farbstoffmolekülen entspricht. Diese liegt im Bereich von einigen Ångström bzw. Nanometern, während sichtbares Licht auf Durchmesser nur wenig unterhalb eines Mikrometers fokussiert werden kann. Verdünnt man eine Probe jedoch so weit, dass im Mittel nicht mehr als ein Molekül im beleuchteten (bzw. detektierten) Volumen ist, so lässt sich mit räumlich hochauflösenden Mikroskopiemethoden die räumliche Isolierung einzelner Chromophore erreichen.

Eine wichtige Technik zur Detektion einzelner Moleküle ist die konfokale Mikroskopie [84, 85, 86, 87, 88]. Das grundlegende Prinzip eines konfokalen Mikroskops (dargestellt in Abb. 2.9) beruht darauf, jeweils nur einen (beugungsbegrenzten) Punkt auf der Probe durch Abbildung einer Punktlichtquelle (Lochblende bzw. *Pinhole*) zu beleuchten. Wendet man diese Technik in der Fluoreszenzmikroskopie an, so werden Farbstoffmoleküle, die sich an diesem Ort befinden, angeregt und fluoreszieren. Das Fluoreszenzlicht wird durch dasselbe Objektiv aufgesammelt und mit Hilfe einer Tubuslinse abgebildet. In der Bildebene sitzt ein weiteres Pinhole, durch das im Wesentlichen nur Licht aus der beleuchteten Region der Objektebene transmittiert wird. Die Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht gelingt mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers, der kürzerwelliges Licht reflektiert und längerwelliges Licht transmittiert. Bewegt man nun den Spot relativ zur Probe in Rasterform, kann man ein vollständiges, pixeliertes Bild der Probe erzeugen. Die notwendige Rasterung kann durch Scannen der Probe oder des anregenden Laserstrahls erfolgen. Die Bezeichnung konfokal wird verwendet, weil das Objektiv zweifach verwendet wird: zum Beleuchten der Probe und zur Abbildung, wobei beide Fokusse in der

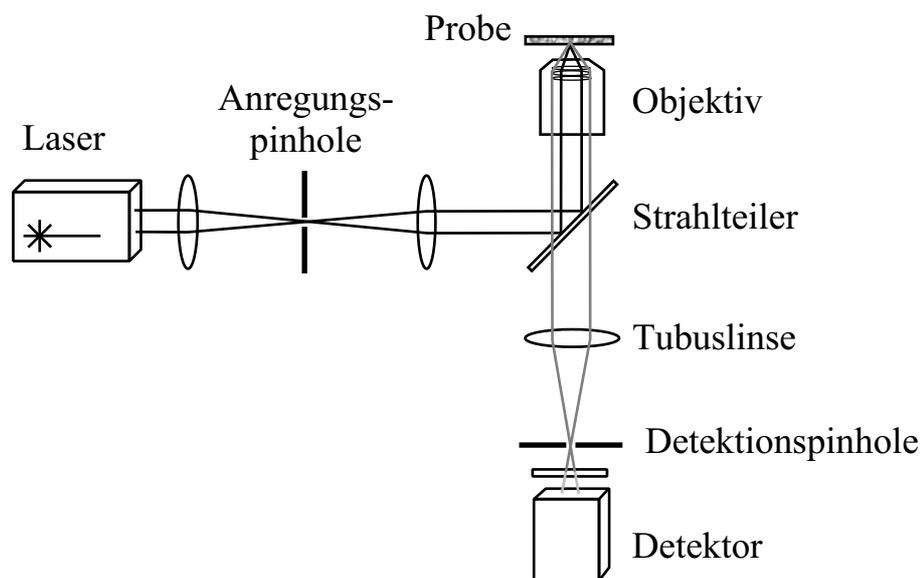


Abbildung 2.9: Aufbau eines konfokalen Mikroskops mit ∞ -Optik.

Objektebene zusammenfallen.

Der Vorteil eines konfokalen Mikroskops gegenüber einem herkömmlichen Aufbau ist seine hohe Tiefenauflösung. Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene des Objektivs wird nicht mehr in die Ebene des Detektionspinholes abgebildet, ist dort defokussiert und wird durch die Lochblende geblockt. Dies ist in Abb. 2.10 illustriert. Durch zusätzliches Scannen der Probe in z-Richtung (entlang der optischen Achse) lässt sich damit eine dreidimensionale Auflösung erreichen.

Die Unterdrückung von Hintergrund- und Streusignal zum Erreichen eines guten Signal-zu-Untergrund-Verhältnisses ist ein Hauptargument für den Einsatz konfokaler Mikroskopie in der Einzelmolekülspektroskopie. Zuvor hat sich diese Technik vor allem in der Biologie durchgesetzt. Durch ihre dreidimensionale Auflösung ermöglicht sie die Aufnahme von Bildern in Schnittebenen ohne Probenschnitte. Die grundlegenden Ideen gehen in die 50er Jahre zurück, als Young und Roberts erstmals das Scannen eines Spots im Mikroskop vorschlugen [89] und Minski das konfokale Prinzip erfand (1955) und patentieren ließ [90, 91]. Größere Bedeutung erlangte es erst innerhalb der letzten 20 Jahre, stimuliert durch die Entwicklungen im Laserbereich. Für Einzelmoleküluntersuchungen wurde es erstmals 1994 eingesetzt [92].

Neben der konfokalen Mikroskopie soll hier ein kurzer Überblick über weitere mikroskopische Techniken gegeben werden, die zur Detektion einzelner Moleküle eingesetzt werden:

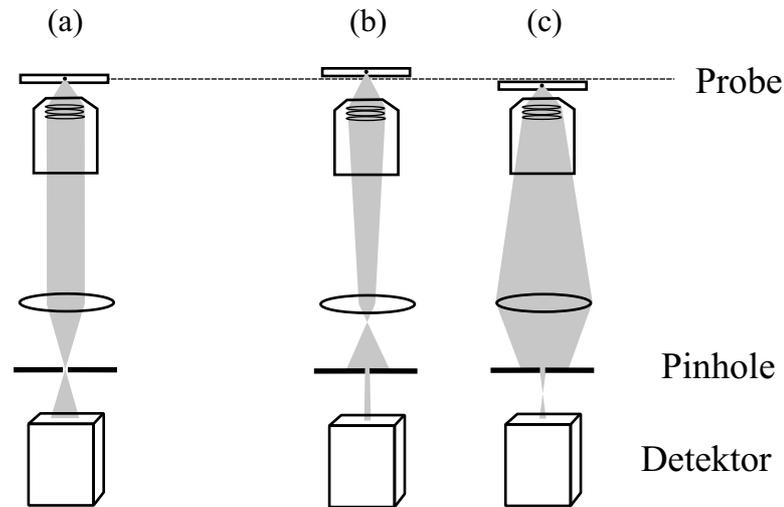


Abbildung 2.10: Effekt des Detektionspinholes in einem konfokalen Mikroskop zur Tiefenauflösung. (a) Fluoreszenz aus dem Fokus gelangt fast vollständig auf den Detektor, während Fluoreszenz außerhalb des Fokusses zum großen Teil am Pinhole geblockt wird (b,c).

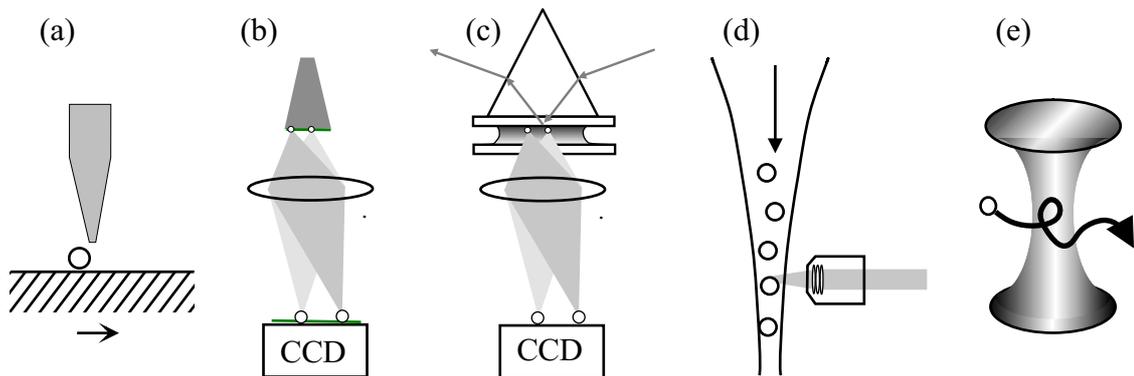


Abbildung 2.11: Schemata verschiedener Einzelmoleküldetektionstechniken: (a) Nahfeldmikroskopie, (b) Imaging mit Weitfeldanregung, (c) Imaging mit TIR-Anregung, (d) Detektion von Photonenbursts und (e) Fluoreszenzkorrelationspektroskopie.

Nahfeldmikroskopie (*Near field scanning optical microscopy*, NSOM)[48, 49, 50, 51, 52, 53]: Dabei wird eine Lichtquelle mit kleiner Apertur (deutlich kleiner als die Lichtwellenlänge) in sehr geringem Abstand (ca. 10 nm) über die Probe gerastert. Als Lichtquelle wird häufig eine gezogene und metallbedampfte Glasfaser verwendet. Man erreicht ein durch die Größe der Apertur der Lichtquelle bestimmtes, höheres Auflösungsvermögen, kann aber nur Moleküle auf Oberflächen untersuchen. Außerdem führt der geringe Abstand zwischen Beleuchtungsquelle und Molekül zu veränderten molekularen Eigenschaften.

Imaging : Durch Weitfeldanregung [56] oder über das evaneszente Feld einer Totalreflexion (*total internal reflection*, TIR) [57] werden Moleküle in einem größeren Bereich ($\sim 100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$) gleichzeitig angeregt und ihre Fluoreszenz durch herkömmliche Mikroskopie auf eine CCD-Kamera abgebildet. Es entstehen ähnliche Bilder wie bei Rastertechniken, jedoch können alle Pixel simultan detektiert werden. Die Technik eignet sich besonders für dünne Proben. Das konfokale Prinzip kann bei dieser Technik nicht angewendet werden und die Tiefenauflösung ist deshalb schlechter.

Einzelmoleküldetektion im Flüssigkeitsstrahl (*Photon Burst Detection*) [45] ist eine analytische Methode zum Zählen und Identifizieren von Farbstoffmolekülen. Die Moleküle fließen dabei z. B. in einer Kapillare durch den Laserfokus und werden dort angeregt. Dabei können niedrigste Konzentrationen (10^{-15} M) bestimmt werden und verschiedene Farbstoffe aufgrund ihrer Farbe oder Lebensdauer auch unterschieden werden. Diese Methode ist im Hinblick auf mögliche Anwendungen bei der Sequenzierung von Genen von Interesse.

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*Photon Correlation Spectroscopy*, FCS) [93, 94] ist eine weitere Methoden zur Detektion einzelner Moleküle in Lösung. Durch den Fokus eines konfokalen Mikroskops lässt man Farbstoffe einer Lösung diffundieren, deren Konzentration so niedrig gewählt ist, dass sich im Mittel höchstens ein Molekül im Fokusbereich befindet. Aus der fluktuierenden Fluoreszenzintensität wird die Autokorrelationsfunktion bestimmt. Daraus lassen sich u. a. Diffusionskonstanten ableiten und die Fluoreszenzdynamik untersuchen. Da man aber immer über viele einzelne Moleküle mittelt, handelt es sich hierbei nur im weiteren Sinne um eine Einzelmolekültechnik.

2.3.2 Laterale Auflösung

Die Fluoreszenzspots, die von einzelnen Molekülen erscheinen, sind aufgrund von Fraunhoferscher Beugung nicht in der Größe der Moleküle, sondern erscheinen etwa drei Größenordnungen größer. Ihre sichtbare Größe wird bestimmt durch das Auflösungsvermögen des Mikroskops.

Zur Bestimmung des lateralen Auflösungsvermögens berechnet man zunächst die Intensitätsverteilung in einer Bildebene im Fernfeld bei Beleuchtung einer kreisförmigen Öffnung mit einer ebenen Welle. Das gefundene Muster kann anschließend in die Brennebene einer Linse oder eines Objektivs übertragen werden. Die genaue Herleitung findet sich u.a. in [95], hier sollen nur die wesentlichen Ideen qualitativ dargelegt werden.

Nach dem Prinzip von Huygens kann man jeden Punkt der beleuchteten Öffnung als Quelle einer Kugelwelle $E_A e^{i(\omega t - kR)}/R$ betrachten (R ist der Abstand des Zielpunktes vom Quellpunkt der Kugelwelle, E_A ist die Quellstärke pro Fläche, ω die Frequenz und $k = 2\pi/\lambda$ die Wellenzahl). Für jeden Punkt der Bildebene kann man die Beiträge aller Kugelwellen aufsummieren, indem man alle Beiträge über die Fläche der Öffnung integriert. Als Ergebnis für die Intensitätsverteilung erhält man das bekannte Airy-Muster:

$$I(r) = I_0 \left(\frac{2J_1\left(\frac{kar}{f}\right)}{\frac{kar}{f}} \right)^2 \quad (2.5)$$

$J_1(x)$ ist die Besselfunktion erster Ordnung, k die Wellenzahl, a der Radius der Öffnung, f die Brennweite und r der Abstand zur optischen Achse in der Bildebene ($r = \sqrt{x^2 + y^2}$ mit den kartesischen Koordinaten x, y in der Bildebene; siehe auch Abb. 2.13). Der Intensitätsverlauf ist in Abb. 2.12 dargestellt. Die Funktion hat ihre ersten Nullstellen bei Argumenten kar/f von 3,832 und 7,016, die in der Bildebene zu einer ringförmigen Struktur führen. Der Großteil der Intensität (84 %) liegt im zentralen Peak, nur etwa 7 % im ersten Ring. Die maximale Intensität im ersten Ring ist entsprechend auf 1,75 % des Zentrums abgefallen. Bei linearer Skalierung erscheint deshalb nur ein vermeintlich gaußförmiger, heller Spot (siehe Dichteplot, unten links in Abb. 2.12), nur bei Betonung der niedrigen Intensitäten zeigt sich die ringförmige Struktur (Dichteplot rechts unten).

Der Abstand vom Maximum zur ersten Nullstelle wird zur Definition des Auflösungsvermögens nach Rayleigh verwendet. Danach bezeichnet man zwei inkohärente Punktlichtquellen als gerade voneinander aufgelöst, falls das Maximum der Intensitätsverteilung der einen Quelle im ersten Minimum der Intensitätsverteilung der zweiten Quelle ($kar/f = 3,832$) liegt. Beide Maxima trennt dann ein Minimum mit 73,5 % der Maximaintensität. Als Auflösung ergibt sich daraus $\Delta x_{Ray} = 3,832f/(ka)$. Unter Einführung der **numerischen Apertur** NA

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad (2.6)$$

lässt sich dies in den gängigen Ausdruck umformen (n ist dabei der Brechungsindex des Mediums, definiert über die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichts im Medium, $n = c_{vac}/c_{med}$, und α der maximal auftretende Winkel zur optischen Achse):

$$\Delta x_{Ray} = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (2.7)$$

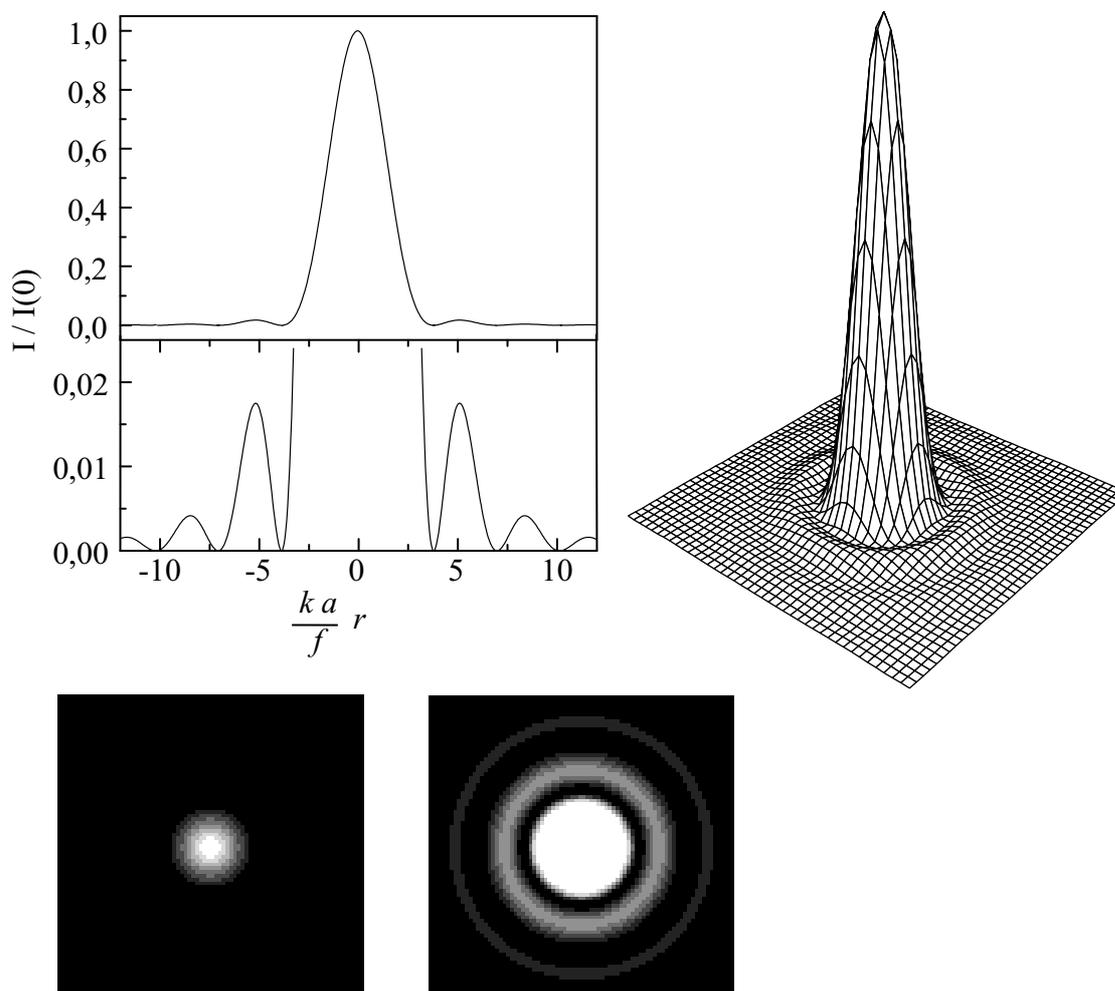


Abbildung 2.12: Das Airy-Muster nach Gl. 2.5 als Intensitätsverteilung einer Punktlichtquelle.

Die eigentliche Halbwertsbreite Δx_{hb} des Peaks liegt mit

$$\Delta x_{hb} = \frac{0,51\lambda}{NA} \quad (2.8)$$

noch etwas unter dem Rayleighschen Wert. Die Gleichungen zeigen, dass das Auflösungsvermögen rein von der Wellenlänge des verwendeten Lichts und von der (effektiv ausgenutzten) numerischen Apertur des Objektivs abhängen, nicht jedoch von der Vergrößerung. Das Auftreten des Brechungsindex n in der numerischen Apertur kann man als effektive Reduktion der Wellenlänge im Medium gegenüber dem Vakuum verstehen (bei gleichbleibender Frequenz bzw. Energie des Lichts):

$$\lambda = \frac{\lambda_{vac}}{n} \quad (2.9)$$

Die Verwendung von Immersionsmedien wie Öl mit $n = 1,52$ oder Wasser mit $n = 1,33$ ist deshalb von großem Vorteil für das Erreichen höherer Auflösungen, bei Tieftemperaturexperimenten jedoch nicht möglich.

Mit Hilfe des Airy-Musters ist nun bekannt, wie ein Objektpunkt in der Bildebene erscheint. Man nennt die Funktion in Gl. 2.5 deshalb auch Punktübertragungsfunktion für die Intensität bei Abbildung durch eine zirkularsymmetrische, aberrationsfreie Linse. Das Konzept der Übertragungsfunktionen lässt sich ausweiten zur Berechnung komplexer Bilder und Intensitätsverteilungen. Darauf soll jedoch hier verzichtet werden, da es zur Abbildung einzelner Moleküle nicht nötig ist.

Bewegt man ein einzelnes Molekül in der Fokusebene durch den Anregungsspot, wird das Molekül entsprechend der Intensitätsverteilung des Laserspots angeregt und fluoresziert. Man tastet mit dem Molekül dabei die Lichtverteilung in der Probe ab und erhält aus der detektierten Fluoreszenz die Intensitätsverteilung des Anregungslichts in der Probenebene, im Idealfall also das beugungsbegrenzte Airy-Muster. Die x,y-Koordinaten sind die des Moleküls in der Objektebene, gegeben durch die Rasterbewegung. Verwendet man ein (geeignetes) Pinhole, lässt sich die Auflösung noch verbessern [84]:

$$\Delta x_{hb\,konf} \approx \frac{0,4\lambda}{NA} \quad (2.10)$$

Dies ist verständlich, weil das Muster bei der Abbildung auf den Detektor noch verändert wird. Die Intensität aus dem Maximum der Verteilung kann zum größten Teil das Pinhole transmittieren, weil das Pinhole darauf justiert ist. Signal aus dem Bereich von nur noch halber Intensität wird aber am Pinhole zu einem größeren Bruchteil geblockt, weil es nicht auf das Zentrum des Pinholes abgebildet wird. So werden die Flanken des Signals überproportional reduziert und die Verteilung effektiv schmaler.

Die im konfokalen Sinne optimale Größe des Pinholedurchmessers ist der doppelte Wert des Rayleighschen Auflösungsvermögens Δx_{ray} multipliziert mit der Vergrößerung M des Mikroskops. Dann kann gerade die zentrale Airy-Scheibe das Detektionspinhole transmittieren. Die Vergrößerung ist durch das Objektiv vorgegeben und bei richtiger Wahl der Tubuslinse gegeben durch das Verhältnis der Brennweiten von Tubuslinse und Objektiv (dies gilt nur für Mikroskope mit ∞ -korrigierten Objektiven, bei denen kein Zwischenbild bzw. nur eins im Unendlichen auftritt):

$$M = -\frac{f_{tub}}{f_{obj}} \quad (2.11)$$

Das Minus soll dabei die Bildumkehr andeuten. Typische Vergrößerungen der eingesetzten Mikroskopobjektive betragen $60\times$, so dass sich optimale Detektionsspinhole-Durchmesser von $30\ \mu\text{m}$ ergeben.

2.3.3 Räumliche Intensitätsverteilung

Im letzten Abschnitt wurde die Intensitätsverteilung in der Bildebene eines Objektivs dargelegt. Dies geschah unter vollständiger Vernachlässigung von Aberrationen, unter paraxialer Näherung und der Annahme gleichförmiger Beleuchtung. Diese Fehler sind aufgrund der Qualität der modernen Objektive bei optimaler Justierung nicht von Bedeutung. Sie rechtfertigen aber, das komplexe Airy-Muster näherungsweise durch ein Gauß-Profil zu beschreiben:

$$I(r) = I_0 e^{-\frac{r^2}{\omega^2}} \quad (2.12)$$

Dabei ist ω der Strahlradius, bei dem die Intensität auf $\frac{1}{e}$ des Maximalwerts abgefallen ist. Oft tritt im Zähler oder Nenner noch ein Faktor 2 auf, der nur die Definition von ω beeinflusst, die von Autor zu Autor unterschiedlich sein kann. In der hier getroffenen Wahl ist die zugehörige Halbwertsbreite

$$\Delta x_{hb} = 2\sqrt{\ln 2} \omega \cong 1,67 \omega. \quad (2.13)$$

Die gute Näherung des Airy-Musters durch ein Gauß-Profil, insbesondere im Bereich des zentralen Peaks, ist in Abb. 2.13 veranschaulicht.

Zur Beschreibung der Intensitätsverteilung im kompletten Volumen um den Fokus, also nicht nur lateral, sondern auch axial (z -Richtung, entlang der optischen Achse), eignet sich der Formalismus der Gaußschen Strahlen, der auch für die Beschreibung der Intensitätsverteilung in Resonatoren und Laserstrahlen verwendet wird. Der Strahl wird durch sphärische Wellenfronten festgelegt, deren Strahlradius gegeben ist durch

$$\omega^2(z) = \omega_0^2 + \left(\frac{\lambda z}{n\pi\omega_0}\right)^2 \quad (2.14)$$

Die Fokusebene liegt bei $z = 0$, und dort ist der minimale Strahlradius ω_0 . Befindet man sich nur geringfügig außerhalb der Fokusebene, so dass $|z| > \omega_0$ gilt, dann erhält man $\omega(z) = \frac{\lambda}{\pi\omega_0} z$. Dies ist der geradlinige Strahlverlauf entsprechend einfacher geometrischer Optik. Maßstäblich ist der gesamte axiale Strahlverlauf nicht

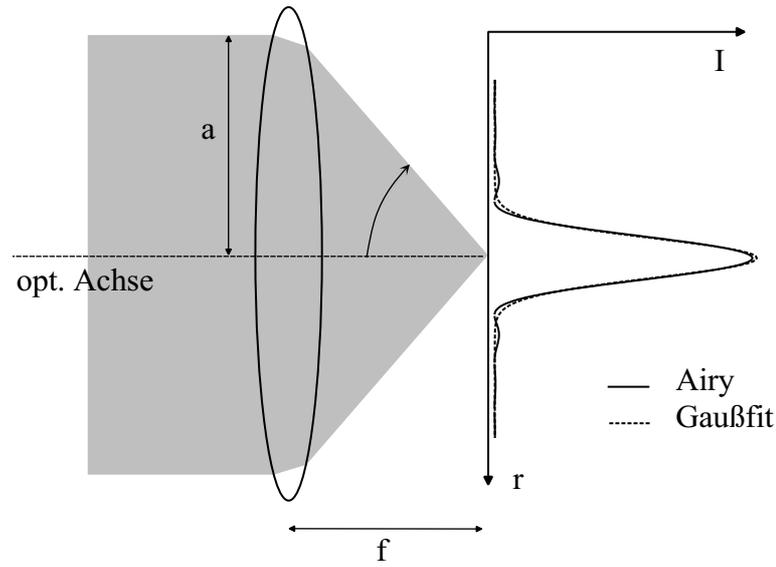


Abbildung 2.13: Vergleich zwischen Gauß- und Airy-Muster.

darstellbar, da nur im Fokusbereich die wichtigen Abweichungen von geometrischer Optik auftreten.

Aus Gründen der Energieerhaltung ist nun die dreidimensionale Intensitätsverteilung gegeben durch

$$I(r, z) = I_0 e^{-\frac{r^2}{\omega^2(z)}} \frac{\omega_0^2}{\omega^2(z)}. \quad (2.15)$$

Mit Gl. 2.14 zeigt sich, dass die Intensitätsverteilung entlang der z -Achse ein Lorentz-Profil besitzt.

2.3.4 Axiale Auflösung im konfokalen Mikroskop

Durch das Detektionsspinhole in einem konfokalen Mikroskop unterscheidet sich in axialer Richtung die effektiv detektierbare Intensitätsverteilung von der Intensitätsverteilung durch die Beleuchtung der Probe. Die Verteilung kann ähnlich wie zur Bestimmung der lateralen Auflösung hergeleitet werden zu [88]

$$I(z) = I_0 \left(\frac{\sin(nkz(1 - \cos \alpha))}{nkz(1 - \cos \alpha)} \right)^2. \quad (2.16)$$

Daraus ergibt sich als Halbwertsbreite

$$\Delta z_{hb} = \frac{0,45\lambda}{n(1 - \cos \alpha)}. \quad (2.17)$$

Für kleine Winkel α lässt sich dies auch in der Form $\Delta z_{hb} \approx \frac{0,9n\lambda}{NA^2}$ unter Verwendung der numerischen Apertur schreiben. Die Abweichungen für Δz_{hb} bei Verwendung der paraxialen Theorie statt der exakten integralen Theorie liegen selbst bei numerischen Aperturen von 0,85 nur bei wenigen Prozent.

In Abb. 2.14 sind abschließend die Intensitätsverteilungen, die in einem konfokalen Mikroskop auftreten, anschaulich dargestellt. In A und B sind die Intensitätsverteilung des Beleuchtungsflecks der Anregung und das Analogon für die Detektion, die Detektionswahrscheinlichkeit (hinter dem Pinhole) eines Photons aus dem entsprechenden Beleuchtungsbereich, abgebildet. In C ist schließlich das definierte Abbildungsvolumen eines konfokalen Mikroskops veranschaulicht, das aus der Faltung der Verteilungen von A und B entsteht.

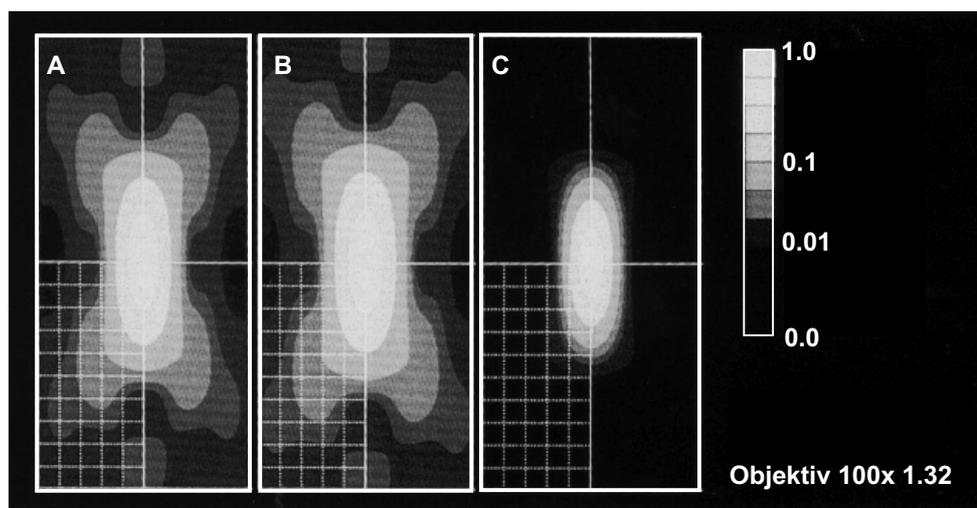


Abbildung 2.14: Verteilungen im Probenbereich in einem konfokalen Mikroskop (optische Achse in vertikaler Richtung): (A) Intensitätsverteilung des Beleuchtungsflecks. (B) Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Detektion eines Photons hinter dem Detektionspinhole. (C) Faltung der Verteilungen A und B, die die Anregungs- und Detektionswahrscheinlichkeit (auch Punktübertragungsfunktion) in einem konfokalen Mikroskop darstellt (aus [84], Berechnung für $\lambda = 488$ nm, Rasterabstand in der Abb.: 100 nm).

Die theoretischen Werte für die axiale und laterale Auflösung in einem konfokalen Mikroskop bei Verwendung der Wellenlänge $\lambda = 514$ nm, die unter optimalen Bedingungen erreicht werden können, sind $\Delta z_{hb} = 0,4 \mu\text{m}$ und $\Delta x_{hb} = 0,2 \mu\text{m}$ für ein

Immersionsobjektiv ($n = 1,5$) mit $NA = 1,3$ (vgl. Abb. 2.14 C) bzw. $\Delta z_{hb} = 0,6 \mu\text{m}$ und $\Delta x_{hb} = 0,3 \mu\text{m}$ für ein Trockenobjektiv mit $NA = 0,85$.

2.4 Anforderungen an die Systeme und die Apparatur zur Einzelmolekülspektroskopie

Die Detektion einer ausreichenden Anzahl von Fluoreszenzphotonen einzelner Moleküle ist das Hauptproblem in jedem Einzelmolekülexperiment. Es bestehen deshalb strenge Anforderungen an die Farbstoffmoleküle und die Detektionsapparatur.

2.4.1 Fluoreszenzrate

In typischen spektroskopischen Ensembleexperimenten wird eine große Anzahl an Molekülen angeregt, jedes davon aber nur wenige Male pro Sekunde. Zur Einzelmolekülspektroskopie reicht diese gelegentliche Anregung bei weitem nicht aus. Die Moleküle müssen tausend und mehr Anregungszyklen pro Sekunde durchlaufen. Die Obergrenze an Anregungszyklen ist durch die Lebensdauer des angeregten Zustands gegeben, der zu einer Sättigung der Fluoreszenzrate führt. Mit typischen Lebenszeiten von einigen Nanosekunden ist die maximal denkbare Fluoreszenzemissionsrate 10^8 Photonen pro Sekunde.

Diese Rate wird jedoch durch mehrere Prozesse stark eingeschränkt. Es treten häufig strahlungslose (*non radiative, nr*) Relaxationsprozesse auf, die die Fluoreszenzrate k_r mindern. Das Auftreten solcher Prozesse wird quantifiziert in der Fluoreszenzquantenausbeute $\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$, die möglichst nahe bei 1 liegen sollte. Zu den strahlungslosen Prozessen zählen innere Konversion in den Grundzustand mit der Rate k_{IC} , aber auch Übergänge in Dunkelzustände, insbesondere den Triplettzustand mit der Rate k_{ISC} . Letztere führen zu Dunkelphasen in der Fluoreszenz. Je nach dem Verhältnis zwischen den Raten in und aus den Dunkelzuständen mindern solche Prozesse die Fluoreszenzzählraten mehr oder weniger stark. Die zahlreichen Anregungszyklen führen auch zu erhöhter Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Photobleichprozessen (Rate k_{bl}), die besonders bei Raumtemperatur stark limitierend sind. Diese Prozesse erlauben nur in sehr kurzen Zeitbereichen die Durchführung der Messungen, oft Sekunden und weniger. Danach sind die Moleküle photochemisch oder photophysikalisch verändert und nicht mehr anregbar. Die Gesamtrate der strahlungslosen Prozesse ist die Summe dieser einzelnen Raten $k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC} + k_{bl}$.

Die zur Anregung der Moleküle nötigen Laserintensitäten bzw. -leistungen lassen sich über den Absorptionsquerschnitt σ der Moleküle, also der Fläche, bei der ein transmittierendes Photon zur Anregung führt, abschätzen. Dieser steht in Beziehung mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ (auch molarer, dekadischer Absorptionskoeffizient), der über das Lambert-Beersche Gesetz definiert ist.

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cd} \quad (2.18)$$

Es beschreibt die Abnahme der Intensität eines Lichtstrahls, der durch eine Probe der Dicke d mit absorbierenden Molekülen in der Konzentration c verläuft. Das Produkt im Exponenten ϵcd wird optische Dichte genannt. Der Extinktionskoeffizient ϵ ist eine frequenzabhängige Molekülkonstante mit der Einheit $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, die für stark absorbierende Farbstoffmoleküle wie Terrylen im Absorptionsmaximum Werte um $100\,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ und darüber hinaus erreichen kann.

Der Wirkungsquerschnitt jedes einzelnen Moleküls für die Absorption eines Photons ist definiert als Quotient aus natürlichem Absorptionskoeffizienten α ($= \epsilon \cdot \ln 10 \approx 2,3 \epsilon$) und der Avogadro-Konstante N_A [96].

$$\sigma = \frac{\alpha}{N_A} \approx 2,3 \frac{\epsilon}{N_A} \quad (2.19)$$

Der Wirkungsquerschnitt σ liegt für die interessierenden Moleküle bei $4 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ oder 4 \AA^2 . Für Tieftemperaturexperimente ist jedoch eine starke Vergrößerung des Wirkungsquerschnitts möglich: Nimmt bei tiefer Temperatur die Linienbreite eines elektronischen Übergangs ab, so verstärkt sich die Absorption in dem reduzierten Frequenzbereich, was einer Vergrößerung des Wirkungsquerschnitts entspricht. Für schmale Nullphononenübergänge bei tiefen Temperaturen kann sich der Wirkungsquerschnitt um bis zu 5 Größenordnungen auf 10^{-11} cm^2 erhöhen [97]. Die zur Anregung nötigen Laserleistungen P betragen in diesem Fall wenige Nanowatt, fokussiert auf eine Fläche A einiger Mikrometer. Bei höheren Temperaturen werden üblicherweise Laserstrahlen mit Leistungen zwischen einem halben und einigen Mikrowatt beugungsbegrenzt fokussiert.

Unter Einbeziehung der Detektionseffizienz η_d , auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird, kann die Anzahl detektierter Fluoreszenzphotonen N_s innerhalb der Integrationszeit Δt abgeschätzt werden, wobei zu beachten ist, dass in 2.20 keine Dunkelzustände einbezogen sind und dies daher nur als obere Abschätzung verwendet werden kann ($\sigma = \sigma(\nu)$, h : Plancksche Konstante):

$$N_s = \eta_d \phi_f \frac{P}{h\nu} \frac{\sigma}{A} \Delta t \quad (2.20)$$

Unter typischen Bedingungen für Raumtemperatur-Einzelmolekülexperimente ($\eta_d = 5\%$, $\phi_f = 1$, $P = 1\ \mu\text{W}$, $\sigma = 4\ \text{\AA}^2$, $h\nu = 4 \cdot 10^{-19}\ \text{J}$, $A = 0,1\ \mu\text{m}^2$) erhält man Zählraten $N_s/\Delta t$ von 50 000 Counts/s. Um mindestens 50 Counts pro Integrationszeit Δt zu detektieren, ist eine minimale Integrationszeit von 1 ms möglich. Bei typischen Tieftemperaturexperimenten sind einige Variablen geringfügig anders (insbesondere werden geringere Leistungen P wegen des höheren Wirkungsquerschnitts σ verwendet; $\eta_d = 1\%$, $\phi_f = 1$, $P = 40\ \text{nW}$, $\sigma = 10^{-11}\ \text{cm}^2$, $h\nu = 4 \cdot 10^{-19}\ \text{J}$, $A = 20\ \mu\text{m}^2$), es werden jedoch ähnliche Zählraten erreicht ($N_s/\Delta t = 50\ 000\ \text{Counts/s}$).

Zusammenfassend sind folgende Eigenschaften von geeigneten Molekülen zu erfüllen:

- a) hoher Absorptionskoeffizient bzw. Wirkungsquerschnitt;
- b) hohe Fluoreszenzquantenausbeute;
- c) geringe Raten in Dunkelzustände, hohe Raten aus ihnen;
- d) geringe Photobleichrate;

bei spektraler Separation sind zusätzlich nötig:

- e) schmale Nullphononenlinien und eine geringe photophysikalische Lochbrennraten.

2.4.2 Detektionseffizienz

Für erfolgreiche Einzelmoleküldetektion muss die Apparatur einen möglichst großen Teil der Fluoreszenzphotonen einsammeln und mit möglichst geringen Verlusten detektieren.

Zur Berechnung des Anteils der emittierten Photonen, die durch ein Objektiv bestimmter numerischer Apertur aufgesammelt werden können, ist es sinnvoll, sich zunächst die Strahlungscharakteristik eines Moleküls anzusehen. Dieses kann als Hertzscher Dipol mit dem Feld E [98] beschrieben werden:

$$\vec{E} = [(\vec{n} \times \vec{p}) \times \vec{n}] k^2 \frac{e^{ikr}}{r} + [3\vec{n}(\vec{n}\vec{p}) - \vec{p}] \left(\frac{1}{r^3} - \frac{ik}{r^2} \right) e^{ikr} \quad (2.21)$$

Hier ist \vec{n} der Richtungseinheitsvektor, \vec{p} der Dipolvektor und k der Betrag des Wellenvektors. Für das Fernfeld ist nur der erste Term in 2.21 ausschlaggebend, der zweite dominiert dagegen im Nah- und intermediären Feld. Da hier nur die relative Winkelabhängigkeit der Strahlungsintensität interessiert, lässt sich der Ausdruck unter Verwendung des Dipoleinheitsvektors \vec{p}_0 stark vereinfachen:

$$I \propto |\vec{E}|^2 \propto [(\vec{n} \times \vec{p}_0) \times \vec{n}]^2 = 1 - (\vec{n}\vec{p}_0)^2 \quad (2.22)$$

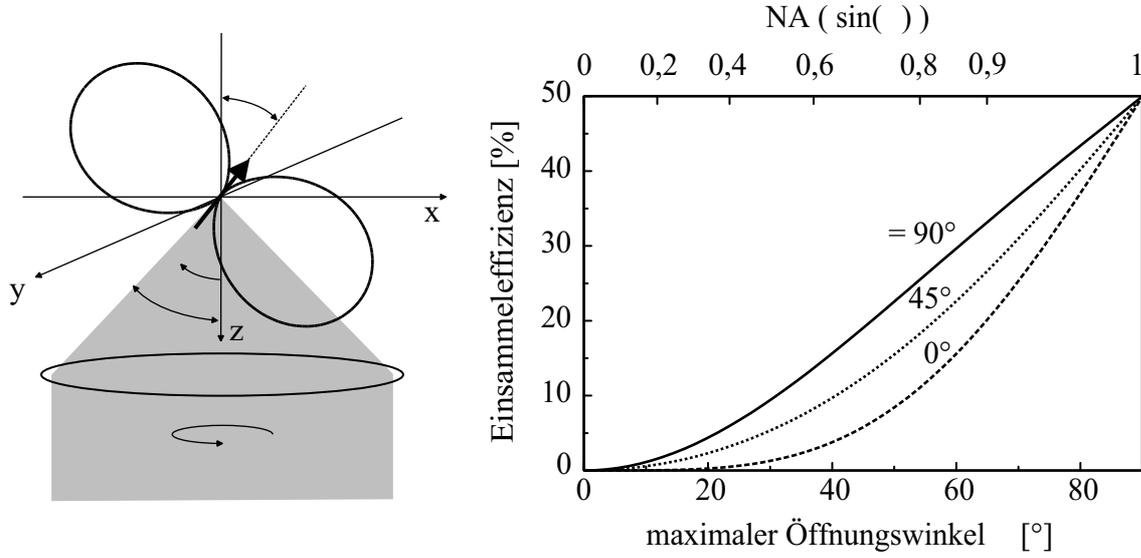


Abbildung 2.15: Veranschaulichung der Einsammeleffizienz und Graph der berechneten Werte in Abhängigkeit der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs bzw. des maximalen Öffnungswinkels für drei verschiedene Dipollagen.

Setzt man für \vec{n} den Einheitsvektor in Kugelkoordinaten $\begin{pmatrix} \cos \varphi \sin \vartheta \\ \sin \varphi \sin \vartheta \\ \cos \vartheta \end{pmatrix}$ und für \vec{p}_0 einen Dipoleinheitsvektor im Winkel Δ zur optischen Achse $\begin{pmatrix} \sin \Delta \\ 0 \\ \cos \Delta \end{pmatrix}$ (ohne Beschränkung der Allgemeinheit in der x-z-Ebene; für $\Delta = 0$ erhält man die vertraute $\sin^2 \vartheta$ -Abhängigkeit der Intensität), so lässt sich durch Integration von 0 bis 2π über φ und von 0 bis zum maximalen Detektionswinkel α über ϑ die Einsammeleffizienz η_{coll} (*coll* für *collection efficiency*) bestimmen:

$$\eta_{coll} = \frac{3}{8\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} (1 - (\vec{n} \cdot \vec{p}_0)^2) d\varphi d\vartheta \quad (2.23)$$

Für $\alpha = 90^\circ$ ergibt sich unabhängig von Δ der Wert $\frac{1}{2}$. In Abb. 2.15 ist das Ergebnis in Abhängigkeit des Öffnungswinkels α (und damit in Abhängigkeit der numerischen Apertur, in Abb. 2.15 jedoch nur im Fall $n = 1$) für drei verschiedene Dipolorientierungen dargestellt. Es ist zu beachten, dass die Anregungswahrscheinlichkeit nicht einbezogen ist. Dies hätte zur Folge, dass für $\Delta = 0^\circ$ alle Werte auf 0 abfallen würden, weil der Dipol nicht angeregt wird. Die Kurve für $\Delta = 45^\circ$ müsste entsprechend der Projektion der Anregung mit $\sin 45^\circ \approx 0,71$ skaliert werden. Die Grenze

der Einsammeleffizienz von Objektiven liegt bei etwa 35 %. Bei Verwendung eines Parabolspiegels wie in den ersten Tieftemperaturaufbauten lassen sich knapp 50 % erreichen.

Das aufgesammelte Licht muss nun verschiedene optische Elemente transmittieren. Bei jedem Übergang Luft-Glas und umgekehrt, wie er bei Linsen und dem Objektiv auftritt, ergibt sich ein Reflexionsverlust von etwa 4 % (dies liegt nicht an niederer Qualität der Optik, sondern in der Natur der Elektrodynamik und kann mit den Fresnelschen Gleichungen gezeigt werden). Die Anwendung von Antireflex-Beschichtungen kann die Verluste jedoch auf unter 1 % pro Übergang senken. Trotzdem haben Mikroskopobjektive mit teilweise mehr als zehn Einzellinsen oft Transmissionen unter 80 %. Ähnliche Verluste treten bei der Reflexion des Lichts an Spiegeln auf. Je nach bedampftem Material verliert man etwa 1 % (Silber) bis 8 % (Alu). Die genauen Werte sind noch von der Polarisation, dem Einfallswinkel und der Wellenlänge abhängig.

Der Einsatz von Filtern zur Trennung der Fluoreszenz von Anregungs- und Streulicht führt zu einer weiteren Reduktion des Signals. Besonders bei Tieftemperaturexperimenten, bei denen man in die langwelligste Nullphononenlinie anregt, wird ein großer Teil von bis zu 80 % des Signals mit dem Anregungslicht spektral abgeschnitten, da das Emissionslicht spektral zu wenig gegenüber dem Anregungslicht verschoben ist. In den mikroskopischen Experimenten, bei denen im Allgemeinen hochvibronisch angeregt wird, sind die Verluste geringer und im Wesentlichen durch die Transmission des dichroitischen Strahlteilers und der eingesetzten Langpass-, Bandpass- oder Notch-Filter gegeben.

Die räumliche Filterung am Pinhole (bei konfokaler Mikroskopie) führt bei (im konfokalen Sinn) optimaler Wahl der Größe des Pinholes zum Blocken von 16 % des Signals, falls sich das Molekül im Zentrum des Anregungssspots befindet. Die Verwendung größerer Pinholes ist sinnvoll zur Steigerung der Zählrate, insbesondere da meist auch noch Aberrationen und geringe Justierfehler auftreten. Sie ist aber mit einer Verringerung der Auflösung verbunden.

Letztes Element im optischen Aufbau ist der Detektor. Neben Photomultipliern mit Quantenausbeuten von selten mehr als 20 % werden Avalanche Photodioden verwendet, die im roten Spektralbereich maximale Quantenausbeuten von 70 % erreichen. CCD-Kameras erreichen Werte um 50 %.

In der Summe können je nach speziellem Aufbau zwischen 0,1 und 10 % der emittierten Fluoreszenzphotonen detektiert werden.

2.4.3 Untergrund

Neben maximaler absoluter Detektion an Signal ist auch das relative Signal gegenüber dem möglichen Untergrund von Bedeutung. Man muss bedenken, dass auf ein Farbstoffmolekül etwa 10^{10} entsprechende Matrixmoleküle im Detektionsvolumen treffen. Um diese Zahl möglichst gering zu halten, ist das Anregungsvolumen auf das Möglichste zu minimieren.

Zu störender Untergrundzählrate führen Rayleigh- und Ramanstreuung. Rayleighstreuung kann spektral geblockt werden, es ist jedoch eine hohe optische Qualität der Proben nötig, um ungenügende Filterwirkung oder störende Filterfluoreszenz zu vermeiden. Ramanstreuung tritt im spektralen Bereich der Fluoreszenz auf und kann nur durch kleine Anregungsvolumina und Verwendung von Materialien mit geringen Streukoeffizienten (wie einkristallinem LiF als Objektträger) reduziert werden. Typische Ramanstreuquerschnitte sind 10^{-28} cm². Neben den Streueffekten kann die Lumineszenz von Verunreinigungen zum Untergrund beitragen. Sie ist jedoch durch die Verwendung von sauberen Objektträgern und reinsten Chemikalien größtenteils vermeidbar. Zu den optisch verursachten Untergrundbeiträgen kommen schließlich noch elektronisch bedingte hinzu. Das ist im wesentlichen die Dunkelzählrate k_{dark} des Detektors mit üblicherweise einigen zehn Counts/s.

Die Statistik in der Photonendetektion verbietet ein konstantes Signalniveau und führt zu variierenden Zählraten um eine mittlere detektierte Photonenzahl \bar{N} . Die individuellen Zählraten N_i genügen einer Poisson-Verteilung

$$p(N_i) = \frac{\bar{N}^{N_i}}{N_i!} e^{-\bar{N}}, \quad (2.24)$$

die die Eigenschaft hat, dass die Varianz (also das mittlere Abweichungsquadrat $\langle (N_i - \bar{N})^2 \rangle$) gleich dem Mittelwert \bar{N} ist bzw. die Standardabweichung gleich $\sqrt{\bar{N}}$ ist. Setzt man die laserinduzierte Untergrundrate pro Einheit Anregungsleistung mit r_{scat} an, so lässt sich das Signal-zu-Rauschen Verhältnis (*signal-to-noise ratio* S/N) angeben (N_s ist das Signal der detektierten Fluoreszenzphotonen nach Gl. 2.20):

$$\frac{S}{N} = \frac{N_s}{\sqrt{N_s + r_{scat} P \Delta t + k_{dark} \Delta t}} \quad (2.25)$$

Das S/N Verhältnis nimmt mit zunehmender Anregungsleistung P zunächst zu, da der Zähler N_s linear mit P zunimmt und der Nenner maximal mit der Wurzel aus P zunimmt. Aufgrund von Sättigung des Fluoreszenzsignals nimmt N_s jedoch bei

höheren Leistungen nicht mehr wesentlich zu, während der Nenner durch den laserinduzierten Untergrunds uneingeschränkt zunimmt. Dadurch nimmt das S/N Verhältnis nach einer optimalen Leistung wieder ab (das Signal-zu-Untergrund Verhältnis nimmt mit zunehmender Leistung stetig ab). Um die beste Qualität der Messkurven zu erhalten, muss die Leistung mit maximalem S/N Verhältnis gefunden werden.

2.5 Nachweis einzelner Moleküle

Wie kann man sicherstellen, dass man tatsächlich ein einzelnes Molekül detektiert? Als Hinweise oder Beweise können verschiedene experimentelle Befunde dienen:

Ein wichtiger Hinweis auf Einzelmoleküldetektion ergibt sich aus dem Vergleich von gemessener und kalkulierter Konzentration an Chromophoren in der Probe. Dazu zählt man die Einzelmolekülsignale, die bei räumlich isolierenden Techniken als Spots im Fluoreszenzbild und bei spektraler Separation als lorentzförmige Linienprofile (ihrerseits ein Hinweis) auftreten, bezieht sie auf das entsprechende Volumen und schätzt parallel dazu die erwartete Konzentration durch die Verdünnungsschritte ab. Aufgrund schwer kontrollierbarer bzw. reproduzierbarer Abschnitte in manchen Methoden der Probenpräparation und nicht beobachtbarer Moleküle aufgrund der Anregungspolarisation treten dabei jedoch häufig geringe Abweichungen auf.

Ein sehr starkes Argument für Einzelmoleküldetektion ist ein stufenweises, sogenanntes digitales Abbrechen der Fluoreszenz (z.B. durch plötzliches Photobleichen oder bei Tieftemperatur durch spektrale Sprünge; vgl. Abb. 6.25) und häufig auch Wiederanschalten des Signals. Diese Vorgänge werden nur bei einzelnen Quantensystem beobachtet, nicht aber bei der Emission mehrerer, unsynchronisierter Systeme, bei denen eine zufällige zeitliche Übereinstimmung von Übergängen wahrscheinlichkeits-theoretisch ausgeschlossen ist.

Polarisationsabhängige Messungen können Hinweise auf die Detektion eines einzelnen Dipols liefern. Dreht man das linear polarisierte Anregungslicht im Verlauf des Experiments, so treten Maxima im Fluoreszenzsignal auf, wenn die Laserpolarisation parallel zur Projektion des molekularen Übergangsdipols in die Anregungsebene (x-y-Ebene) ist, und Minima, wenn sie senkrecht dazu ist und das Molekül nicht angeregt wird. Die Anregungswahrscheinlichkeit und damit die Fluoreszenzintensität ist vom Winkel φ zwischen projiziertem Übergangsdipolmoment \vec{p}_{xy} und elektrischem Feldvektor \vec{E} abhängig:

$$I(\varphi) \propto |\vec{p}_{xy}\vec{E}|^2 \propto \cos^2 \varphi \quad (2.26)$$

Als letzter Nachweis soll hier noch ein quantenoptisches Experiment genannt werden, das *Photon Antibunching*. Mit diesem Experiment weist man nach, dass einzelne Chromophore in einem kurzen Zeitintervall im Mittel nur ein Photon emittieren. Die Wahrscheinlichkeit, nach einer Emission ein zweites Photon zu detektieren, strebt für kurze Zeiten gegen Null. Im Ensemble von vielen Molekülen ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass zwei Teilchen zufällig gleichzeitig emittieren. Einzelne Quantensysteme müssen nach der Emission eines Photons aber erst wieder angeregt werden und können deshalb kurzzeitig nicht fluoreszieren.

Kapitel 3

Theoretische Grundlagen

3.1 Stationäres Verhalten und Dynamik im Drei-Niveau-System

Das Fluoreszenzemissionsverhalten eines organischen Farbstoffmoleküls kann näherungsweise mit dem Modell eines Drei-Niveau-Systems, bestehend aus zwei Singulett-Zuständen S_0 und S_1 sowie einem Triplett-Zustand T_1 , beschrieben werden. Weitere Unterstrukturierungen in Schwingungsniveaus sind nicht nötig, da diese nur extrem kurzlebige Zwischenzustände darstellen. Interessiert man sich zunächst nicht für kohärente Effekte, liefert die Lösung der Ratengleichungen für das Drei-Niveau-System die wichtigsten Beziehungen zur Beschreibung der Kinetik und des Sättigungsverhalten der Fluoreszenz eines Farbstoffmoleküls.

3.1.1 Ratengleichungen

In Abb. 3.1 ist das Drei-Niveau-System mit Bezeichnung aller auftretenden Übergänge dargestellt. Die Anregung erfolgt mit einer Pumprate p , die proportional zur Intensität des eingestrahnten Laserlichts ist. Vom angeregten Zustand kann das Molekül (bei 0-0 Anregung) durch stimulierte Emission mit derselben Rate p , oder durch spontane Emission unter Aussendung eines Photons mit der Rate k_{21} in den Grundzustand zurückkehren. Strahlungslose Relaxation sei dabei vernachlässigt, andernfalls wäre k_{21} die Summe aus Fluoreszenz- und strahlungsloser Relaxationsrate. Um die Raten leicht verständlich indizieren zu können, wird der Singulett-Grundzustand S_0 als $|1\rangle$ bezeichnet, der angeregte Singulett-Zustand S_1 mit $|2\rangle$ und der Triplettzustand T_1 mit $|3\rangle$. Vom angeregten Zustand ist ein Über-

gang in den Triplettzustand (*intersystem crossing*) mit der Rate k_{23} möglich. Die Rückkehr daraus in den Grundzustand erfolgt mit der Rate k_{31} .

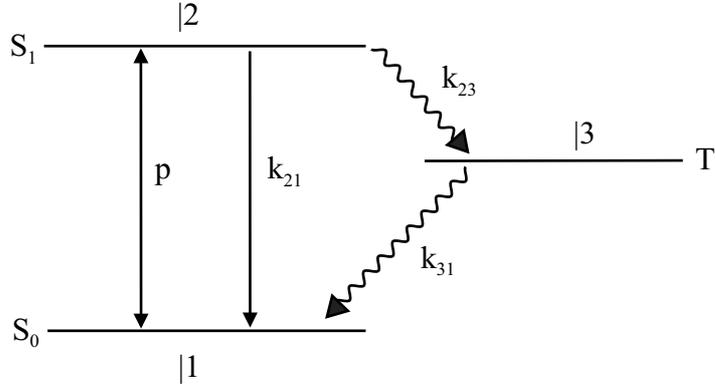


Abbildung 3.1: Das Drei-Niveau-System mit den auftretenden Übergängen

Bezeichnet man die zeitabhängigen, relativen mittleren Besetzungszahlen der Zustände $|1\rangle$, $|2\rangle$ und $|3\rangle$ mit $n_1(t)$, $n_2(t)$ bzw. $n_3(t)$, so lässt sich zur mathematischen Beschreibung der Moleküldynamik das Ratengleichungssystem aufstellen. Zur Normierung wird $n_1(t) + n_2(t) + n_3(t) = 1$ angesetzt.

$$\begin{aligned} \dot{n}_1 &= -pn_1 && +(p + k_{21})n_2 && +k_{31}n_3 \\ \dot{n}_2 &= pn_1 && -(p + k_{21} + k_{23})n_2 && \\ \dot{n}_3 &= && k_{23}n_2 && -k_{31}n_3 \end{aligned} \quad (3.1)$$

Die zeitlichen Änderungen der Besetzungswahrscheinlichkeiten $\dot{n}_i = \frac{d}{dt}n_i$ sind durch die Raten und Besetzungswahrscheinlichkeiten selbst gegeben. Die Pumprate p lässt sich über den Absorptionswirkungsquerschnitt σ des Moleküls und die Intensität I berechnen:

$$p = \frac{\sigma I}{h\nu} \quad (3.2)$$

Bei einer gaußförmigen Intensitätsverteilung des Laserlichts lässt sich die Intensität im Maximum I_0 aus der eingestrahelten Leistung P aufgrund der Beziehung $P = \int_0^\infty I(r) 2\pi r dr$ und Gl. 2.12 berechnen:

$$I_0 = \frac{P}{\pi \omega_{\text{gauss}}^2} \quad (3.3)$$

Da ω üblicherweise auch für die Laserfrequenz ($\omega = 2\pi\nu$) verwendet wird, wurde es zur Vermeidung von Verwechslung indiziert.

Bei Tieftemperaturexperimenten spielt die Frequenzabhängigkeit der Pumprate p eine große Rolle. Diese Abhängigkeit ist zwar auch in Gl. 3.2 über den Wirkungsquerschnitt σ gegeben, üblicherweise wird sie aber unter Einbeziehung der lorentzförmigen Linie explizit formuliert. Dabei soll in Anlehnung an gängige Literatur die Kreisfrequenz des Laserlichts verwendet werden und die Abhängigkeit der Pumprate vom Anregungslaserfeld E_0 zunächst über die Rabi-Frequenz Ω eingeführt werden. Die Rabi-Frequenz ist definiert als $\Omega = \mu_{12} \cdot E_0/\hbar$, wobei μ_{12} der Betrag des Übergangsdipolmoments des Moleküls in Feldrichtung ist. Die Pumprate p ist dann [99]:

$$p = \frac{\Omega^2}{2} \cdot \frac{\frac{1}{T_2}}{(\omega - \omega_0)^2 + (\frac{1}{T_2})^2} \quad (3.4)$$

T_2 ist die Relaxationszeit des optischen Übergangs. Sie ist durch die Lebensdauer des angeregten Zustands T_1 und die reine Phasenrelaxationszeit T_2^* festgelegt durch $\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2^*}$. Der Kehrwert von T_2 ist die halbe Halbwertsbreite der Absorptionslinie $\Delta\omega_{hb}/2$. Unter Verwendung der Beziehung zwischen Intensität und elektrischem Feld $I = \frac{1}{2}\epsilon_0 c E^2$ lässt sich die Pumprate schreiben als

$$p = \frac{\mu_{12}^2 \cdot I}{\hbar^2 \epsilon_0 c} \cdot \frac{\frac{1}{T_2}}{(\omega - \omega_0)^2 + (\frac{1}{T_2})^2} \quad (3.5)$$

3.1.2 Stationäre Lösung - das Sättigungsverhalten

Die mittlere Lebenszeit T_1 des angeregten Zustands führt schon im einfachsten Fall eines Zwei-Niveau-Systems zu einer begrenzten Anzahl an Photonen, die pro Zeiteinheit emittiert werden können. Die maximale Fluoreszenzphotonenrate R_∞^{2LS} ist gegeben durch das Produkt aus der Wahrscheinlichkeit, das Molekül im angeregten Zustand zu finden, dem Kehrwert der Lebenszeit $\frac{1}{T_1} = k_{21}$ des angeregten Zustands und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f :

$$R_\infty^{2LS} = \frac{1}{2} \frac{1}{T_1} \phi_f = \frac{1}{2} k_{21} \phi_f \quad (3.6)$$

Im Drei-Niveau-System verringert sich die maximale Fluoreszenzzählrate noch durch die Möglichkeit des Moleküls, sich im Triplettzustand aufzuhalten. Zur Bestimmung der Fluoreszenzzählrate muss das Ratengleichungssystem 3.1 für den stationären

Fall gelöst werden, d.h. wenn sich die relativen mittleren Besetzungszahlen n_i (für $i = 1, 2, 3$) nicht mehr ändern. Mit $\dot{n}_i = 0$ (für $i = 1, 2, 3$) vereinfacht sich das Differentialgleichungssystem 3.1 zu einem homogenen, algebraischen Gleichungssystem. Da Fluoreszenzphotonen nur vom angeregten Zustand $|2\rangle$ emittiert werden, genügt es, die mittlere Besetzungswahrscheinlichkeit n_2 auch nur für diesen Zustand zu bestimmen:

$$n_2(t = \infty) = \frac{1}{\left(2 + \frac{k_{23}}{k_{31}}\right) + \frac{k_{21} + k_{23}}{p}} \quad (3.7)$$

Setzt man nun für p die Beziehung aus Gl. 3.5 ein, erhält man den intensitäts- und frequenzabhängigen Ausdruck für n_2 :

$$\begin{aligned} n_2(t = \infty, I, \omega) &= \frac{1}{\left(2 + \frac{k_{23}}{k_{31}}\right) + \frac{I_S}{I} \cdot \left(2 + \frac{k_{23}}{k_{31}}\right) \cdot T_2^2 \cdot [(\omega - \omega_0)^2 + \left(\frac{1}{T_2}\right)^2]} \\ &= \frac{\frac{1}{2 + \frac{k_{23}}{k_{31}}} \cdot \frac{I}{I_S \cdot T_2^2}}{(\omega - \omega_0)^2 + \left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + \frac{I}{I_S \cdot T_2^2}} \end{aligned} \quad (3.8)$$

Dabei wurde zur Abkürzung die Sättigungsintensität I_S

$$I_S = \frac{(k_{21} + k_{23})\hbar^2 \varepsilon_0 c}{\left(2 + \frac{k_{23}}{k_{31}}\right) T_2 \mu_{12}^2} \quad (3.9)$$

eingeführt. Die Bedeutung der Sättigungsintensität wird erst in Gl. 3.11 klar. Dort sieht man, dass bei Einstrahlung der Sättigungsintensität gerade die Hälfte der maximalen Zählrate erreicht wird.

Mit Hilfe von Gl. 3.8 kann nun die maximale Fluoreszenzzählrate in einem Drei-Niveau-System angegeben werden, die bei resonanter Anregung und hoher Intensität erreicht werden kann. Sie ist wiederum gegeben aus dem Produkt der Wahrscheinlichkeit, das Molekül im angeregten Zustand zu finden, dem Kehrwert der Lebenszeit $\frac{1}{T_1} (= k_{21} + k_{23})$ dieses Zustands und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f :

$$R_\infty^{3LS} = n_2(t = \infty, I = \infty, \omega = \omega_0) \frac{1}{T_1} \phi_f = \frac{k_{21} + k_{23}}{2 + \frac{k_{23}}{k_{31}}} \phi_f \quad (3.10)$$

Am Nenner erkennt man, dass die maximale Fluoreszenzrate wesentlich vom Verhältnis der Raten in den und aus dem Triplettzustand abhängt. Ist die Rate hinein wesentlich größer als die Rate heraus, verringert sich R_∞^{3LS} drastisch. Ist die Entvölkerungsrate k_{31} des Triplettzustands hingegen größer als die Bevölkerungsrate k_{23} ,

kann selbst eine große Rate k_{23} zu hohen Zählraten führen. Die Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenzrate bei resonanter Anregung in Gl. 3.8 kann nun kompakt angegeben werden zu

$$R^{3LS}(I) = R_{\infty}^{3LS} \frac{\frac{I}{I_S}}{1 + \frac{I}{I_S}} = R_{\infty}^{3LS} \frac{I}{I + I_S}. \quad (3.11)$$

Die Fluoreszenzrate nimmt für kleine Anregungsintensitäten ($I \ll I_S$) linear zu und strebt für hohe Intensitäten gegen ihren Maximalwert R_{∞}^{3LS} (Abb. 5.4 b). Dies kann leicht verstanden werden, wenn man bedenkt, dass die spontane Emissionsrate proportional zur Population des angeregten Zustands S_1 ist. Bei niedriger Intensität ist das Molekül meistens im Grundzustand S_0 . Bei einer Verdopplung der Anregungsintensität treten deshalb doppelt so viele Übergänge von S_0 nach S_1 und zurück auf. Bei hohen Intensitäten ist die Situation ganz anders. Das Molekül ist in diesem Fall schon etwa die Hälfte seiner Zeit, die es im Singulettssystem verbringt, in S_1 , und die andere Hälfte in S_0 . Eine Erhöhung der Intensität kann daran nichts ändern und die Fluoreszenzrate bleibt konstant.

Mit Gl. 3.8 lassen sich außerdem Aussagen zur Linienform machen. Die Sättigung führt zu einer Verbreiterung der lorentzförmigen Linie, wie man am Nenner von Gl. 3.8 erkennen kann. Der additive Term zu $(\omega - \omega_0)^2$ ist allgemein das Quadrat der halben Linienbreite, $(\frac{\Delta\omega_{hb}}{2})^2$, hier $(\frac{1}{T_2})^2 + \frac{I}{I_S \cdot T_2^2}$. Damit ist die Intensitätsabhängigkeit der Linienbreite

$$\Delta\omega_{hb} = \frac{2}{T_2} \sqrt{1 + \frac{I}{I_S}} \quad \text{bzw.} \quad \Delta\nu_{hb} = \frac{1}{\pi T_2} \sqrt{1 + \frac{I}{I_S}}. \quad (3.12)$$

Die Linienbreite hat ihren Minimalwert $\Delta\nu_{hb_0} = \frac{1}{\pi T_2}$ für verschwindende Anregungsintensität und ist nach oben nicht beschränkt (Abb. 5.4 c). Die Leistungsverbreiterung lässt sich anschaulich gut verstehen. In der Nähe der Resonanzfrequenz ist die Fluoreszenzrate höher und damit schon näher an der Sättigung. Bei Erhöhung der Intensität nimmt damit die Fluoreszenz im Zentrum der Lorentzlinie weniger zu als in den Flügeln. Damit wird die Linie breiter. Eine Lorentzform bleibt nach Gl. 3.8 weiterhin erhalten.

3.1.3 Zeitabhängige Lösung - die Dynamik

Um die zeitliche Dynamik in der Fluoreszenz verstehen und auswerten zu können, benötigt man die allgemeine Lösung des Ratengleichungssystems 3.1 für die Besetzungswahrscheinlichkeit $n_2(t)$ des Zustands $|2\rangle$, von dem die Fluoreszenz ausgeht.

Dies erfordert einen erheblichen mathematischen Aufwand, soll aber hier in den wesentlichen Schritten kurz dargelegt werden, um es später auf ähnliche Probleme übertragen zu können.

Durch Laplacetransformation $F(s) = \int_0^{\infty} e^{-st} f(t) dt$ wird das Differentialgleichungssystem in ein algebraisches Gleichungssystem umgewandelt. Die Bezeichnungen der transformierten Größen sind $N_i(s) = \mathcal{L}[n_i(t)]$. Als Anfangsbedingungen werden $n_1(0) = 1$ und $n_2(0) = n_3(0) = 0$ gewählt, was bedeutet, dass das Molekül zur Zeit $t = 0$ im Grundzustand ist. Unter Ausnutzung der Beziehung $\mathcal{L}[\dot{n}_i(t)] = sN_i(s) - n_i(0)$ lautet das Gleichungssystem in Matrixform:

$$\begin{pmatrix} -(p+s) & p+k_{21} & k_{31} \\ p & -(p+k_{21}+k_{23}+s) & 0 \\ 0 & k_{23} & -(k_{31}+s) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_1(s) \\ N_2(s) \\ N_3(s) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.13)$$

Die Lösung für $N_2(s)$ ist durch die Cramersche Regel gegeben als Quotient zweier Determinanten, wobei im Nenner die Determinante der in Gl. 3.13 auftretenden Matrix steht ($\rightarrow D$), während im Zähler die Determinante der Matrix steht, bei der die zweite Spalte durch die Komponenten des Ergebnisvektors ersetzt wurden ($\rightarrow D_2$).

$$\begin{aligned} N_2(s) &= \frac{D_2}{D} = & (3.14) \\ &= \frac{-p(s+k_{31})}{-s(s^2 + s(2p+k_{21}+k_{23}+k_{31}) + p(k_{23}+2k_{31}) + (k_{21}+k_{23})k_{31})} \end{aligned}$$

Das Hauptproblem für die Laplace-Rücktransformation, insbesondere im Falle der analogen Lösung des Ratengleichungssystems für ein 4-Niveau-System oder der optischen Blochgleichungen, ist die Faktorisierung des Nenners. In diesem Fall ist das kein Problem, da eine Nullstelle von D direkt $s=0$ ist und die restliche quadratische Gleichung gelöst werden kann. Obwohl eine exakte Lösung möglich ist, lassen sich die Ausdrücke für die Nullstellen stark vereinfachen, wenn man zur Näherung ausnutzt, dass die Raten in und aus dem Triplett deutlich kleiner sind als die Fluoreszenzrate: $k_{23}, k_{31} \ll k_{21}$. Dazu vernachlässigt man zunächst alle Terme, in denen die Triplett-raten quadratisch auftreten und verwendet die Näherung $\sqrt{X+x} \approx \sqrt{X} + \frac{1}{2}x/\sqrt{X}$ ($x \ll X$) für linear auftretende Triplett-raten im Wurzelterm der Lösungsformel für quadratische Gleichungen. Diese Formel liefert zwei negative Lösungen, eine in der Größenordnung der Fluoreszenzrate und eine in der Größenordnung der Triplett-raten. Danach sind die drei Nullstellen des Nenners in 3.14:

$$s_0 = 0$$

$$\begin{aligned} s_1 &= -(k_{21} + 2p) \\ s_2 &= -\left(k_{31} + \frac{p}{k_{21} + 2p}k_{23}\right) \end{aligned} \quad (3.15)$$

Die Rücktransformation $f(t) = \frac{1}{2\pi i} \int_{c-i\infty}^{c+i\infty} e^{-st} F(s) ds$ (c geeignet groß) gelingt mittels Residuensatz oder nach Partialbruchzerlegung unter Anwendung der Formel $\mathcal{L}^{-1}(G(s)/(s-a)) = G(a)e^{at}$ (wobei $G(s)$ eine beliebige Funktion ohne Polstellen ist) auf alle drei Terme. Das Ergebnis kann auch nach folgendem Schema erreicht werden: Man faktorisiert den Nenner in 3.14. Für jede (einfache) Nullstelle des Nenners bildet man einen Summanden, indem der verschwindende Faktor im Nenner weggelassen wird, im restlichen Bruch die Nullstelle eingesetzt wird und das Ergebnis mit einer Exponentialfunktion multipliziert wird, deren Argument das Produkt aus der Nullstelle und der Funktionsvariablen ist. Das Ergebnis lautet:

$$\begin{aligned} n_2(t) &= \mathcal{L}^{-1}\left(\frac{p(s+k_{31})}{s(s-s_1)(s-s_2)}\right) = \\ &= \frac{pk_{31}}{(-s_1)(-s_2)} + \frac{p(s_1+k_{31})}{s_1(s_1-s_2)}e^{s_1t} + \frac{p(s_2+k_{31})}{s_2(s_2-s_1)}e^{s_2t} \end{aligned} \quad (3.16)$$

Die Bedeutung dieser Funktion wird erst im nächsten Abschnitt klar, wenn gezeigt wird, dass diese Funktion in Form der Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität gemessen werden kann und damit unter anderem die Triplettraten bestimmt werden können. Dort werden auch weitere Vereinfachungen vorgenommen und der Funktionsverlauf diskutiert.

3.1.4 Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität

Die Berechnung von Korrelationsfunktionen ist eine statistische Methode zur Analyse von Fluktuationen. In diesem Fall handelt es sich um Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität. Mit der Korrelationsfunktion vergleicht man die Intensität zu einer Zeit t mit der Intensität um ein Zeitintervall τ später. Für jede Verschiebung τ wird der zeitliche Mittelwert über dem Produkt der Intensitäten zur Zeit t und zur Zeit $t + \tau$ gebildet. Damit lassen sich Wahrscheinlichkeitsaussagen machen, nach einer um τ vergangenen Zeit eine bestimmte Intensität zu messen im Vergleich zur Intensität gemessen zur Zeit t . Die zeitliche Verschiebung führt bei statistischen Schwankungen zu Änderungen in der Amplitude der Korrelationsfunktion, die gerade bei den charakteristischen Zeiten der zugrundeliegenden Prozesse liegt.

Klassisch ist die normierte Korrelationsfunktion definiert als [100]

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (3.17)$$

mit der zeitlichen Mittelung

$$\begin{aligned} \langle I(t)I(t+\tau) \rangle &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t+\tau) dt \\ &\approx \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_N I_N I_{N+\frac{\tau}{\Delta t}}. \end{aligned} \quad (3.18)$$

In der Praxis werden die Fluoreszenzphotonen immer über kurze Intervalle Δt gezählt und entsprechend dem zweiten Ausdruck in 3.18 verarbeitet. Quantenmechanisch muss man die Photonenzahlen n korrelieren, indem man in 3.17 I durch n ersetzt. Obwohl das scheinbar nichts ändert, hat es doch die Bedeutung, dass klassisch für die Korrelationsfunktion zur Zeit $\tau = 0$ immer $g^{(2)}(0) \geq 1$ gilt, und zwar aufgrund der Beziehung $0 \leq \langle (I(t) - \langle I(t) \rangle)^2 \rangle = \langle I^2(t) \rangle - \langle I(t) \rangle^2$. Nichtklassisches Licht wie das eines einzelnen Moleküls genügt dieser Bedingung nicht.

Bevor auf die Korrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität einzelner Farbstoffmoleküle eingegangen wird, sollen noch einige Beispiele genannt werden. Zeigt eine Lichtquelle keinerlei Schwankungen, so ist die Korrelationsfunktion auch konstant und hat für alle τ den Wert 1. Gleiches gilt für unkorreliertes Rauschen. Zeigt eine Lichtquelle sinusförmige Schwankungen (wie z.B. Leuchtstoffröhren, moduliert mit der doppelten Frequenz des elektrischen Netzes), die über längere Zeiten periodisch konstant sind, ist auch die Korrelationsfunktion für diese Zeiten eine Sinusfunktion, da die Verschiebung der Intensitäten periodisch zu maximalem und minimalem Überlapp führt. Eine grobe Vorstellung kann man auch gewinnen, wenn man sich eine Lichtquelle vorstellt, die eine gewisse Zeit leuchtet, anschließend dunkel ist, wieder leuchtet, usw. (siehe Abb. 3.2). Leuchtet sie zur Zeit t , so ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass sie zur Zeit $t + \tau$ noch leuchtet, wenn τ kurz im Vergleich zur mittleren Leuchtdauer ist. Für größere Zeiten sind die Leuchtperioden meist beendet, manche haben schon wieder neu begonnen. Die Wahrscheinlichkeit nimmt ab, bis zu einem Wert, der nur noch durch die mittlere Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül leuchtet, gegeben ist. Genau diesen Verlauf zeigt die Korrelationsfunktion.

Bei der Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle ist die Autokorrelationsfunktion ein Maß für die relative Wahrscheinlichkeit zur Zeit $t = \tau$ ein Photon zu detektieren, falls zur Zeit $t = 0$ schon eins detektiert worden ist. Dasselbe gilt aber

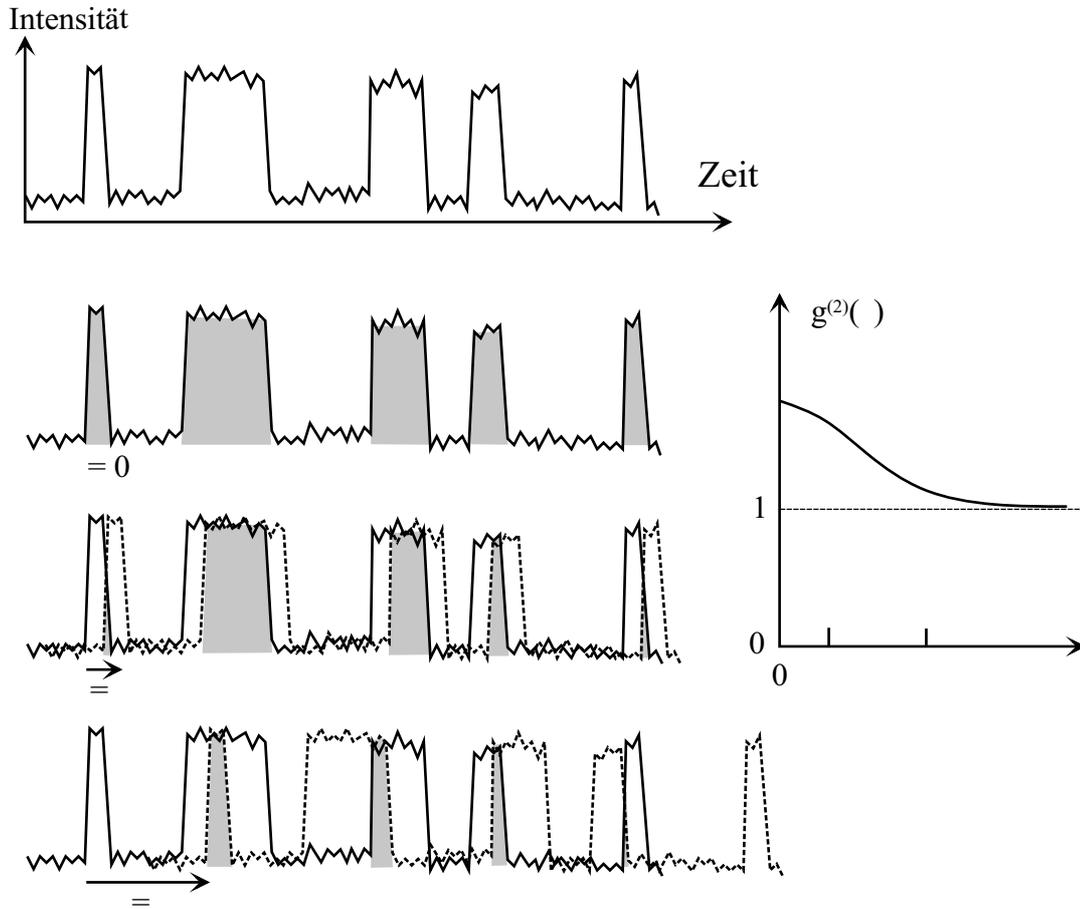


Abbildung 3.2: Zeitlicher Verlauf der Intensität einer blinkenden Lichtquelle. Nach relativer Verschiebung um τ veranschaulicht der Überlapp (grau schattiert) den Wert der Korrelationsfunktion.

für die im letzten Abschnitt berechnete mittlere Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten Zustands. Dort wurden die Anfangsbedingungen so gewählt, dass das Molekül zur Zeit $t = 0$ im Grundzustand ist, also gerade ein Photon emittiert hat. Die Korrelationsfunktion kann unter Beachtung der Normierung mit 3.16 dargestellt werden (der Normierungsdivident $n_2(\infty)$ ist gerade der erste Summand aus 3.16 und unterscheidet sich nur geringfügig von 3.7):

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{n_2(\tau)}{n_2(\infty)} = 1 + \frac{s_2}{k_{31}} e^{s_1 t} + \frac{s_2 + k_{31}}{-k_{31}} e^{s_2 t} \quad (3.19)$$

Für diesen Schritt wurden wieder Summanden in der Größenordnung der Triplett-raten gegenüber jenen in der Größenordnung der Fluoreszenzraten vernachlässigt. Es ist nun sinnvoll, eine effektive Rate k_{23}^{eff} für Übergänge in den Triplettzustand

zu definieren. Sie ist das Produkt aus k_{23} und der Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül im Singulettssystem angeregt ist. Diese Wahrscheinlichkeit ist das Verhältnis der Summe der Raten in den angeregten Zustand zur Summe aller Raten im Singulettssystem:

$$k_{23}^{eff} = \frac{p}{k_{21} + 2p} k_{23}, \quad (3.20)$$

Die Korrelationsfunktion lässt sich nun schreiben:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 - \frac{k_{23}^{eff} + k_{31}}{k_{31}} e^{-(k_{21}+2p)\tau} + \frac{k_{23}^{eff}}{k_{31}} e^{-(k_{23}^{eff}+k_{31})\tau} \quad (3.21)$$

Der Verlauf dieser Funktion ist in Abb. 3.3 (durchgezogenen Linie) dargestellt. Bei kurzen Zeiten zeigt sich die Eigenschaft einer nichtklassischen Lichtquelle. Für $\tau \rightarrow 0$ strebt die Korrelationsfunktion selbst gegen 0. Dies ist in der Literatur als *Antibunching* bekannt und lässt sich folgendermaßen verstehen: Nach der Emission eines Photons zur Zeit $t=0$ befindet sich das Quantensystem im Grundzustand, da es gerade ein Photon emittiert hat. Die Wahrscheinlichkeit, ein zweites Photon zur Zeit $t=0$ zu emittieren, ist Null, da das Molekül vom Grundzustand aus nicht emittieren kann. Die Photonen besitzen damit die Tendenz, in einem endlichen zeitlichen Abstand voneinander emittiert zu werden, dessen Größenordnung der Fluoreszenzlebensdauer (ns-Bereich) entspricht.

Der durch Gl. 3.21 festgelegte Graph ist nur für den Fall inkohärenter Anregung korrekt, da von den einfachen Ratengleichungen ausgegangen wurde. Für die in der Praxis notwendige Laseranregung treten kohärente Effekte in Form von Rabioszillationen auf (Abb. 3.3, gestrichelte Linie). Zu ihrer Herleitung müssen die Ratengleichungen um die Wechselwirkungsterme und Kohärenzen zwischen molekularem Übergangsdipolmoment und Laserfeld zu den optischen Blochgleichungen [101] erweitert werden. Die Messung der Korrelationsfunktion für solche kurzen Zeiten ($\tau \leq 100$ ns) gelingt mit einem Start-Stop Experiment nach Hanbury Brown und Twiss [102, 103]. Sie wurde erstmals an einem Natriumatomstrahl [104] gemessen, später an einzelnen Ionen in Fallen [105], an einzelnen Farbstoffmolekülen im Festkörper bei tiefen Temperaturen [22, 106] und auf Oberflächen bei Raumtemperatur [107], sowie an einzelnen Proteinen in Lösung [108].

Bei größeren Zeiten beobachtet man in der Korrelationsfunktion den Effekt des *Bunching* in Form eines exponentiellen Abfalls. Die Ursache liegt darin, dass die Photonen in Bündeln auftreten, die von Dunkelphasen unterbrochen sind, in denen

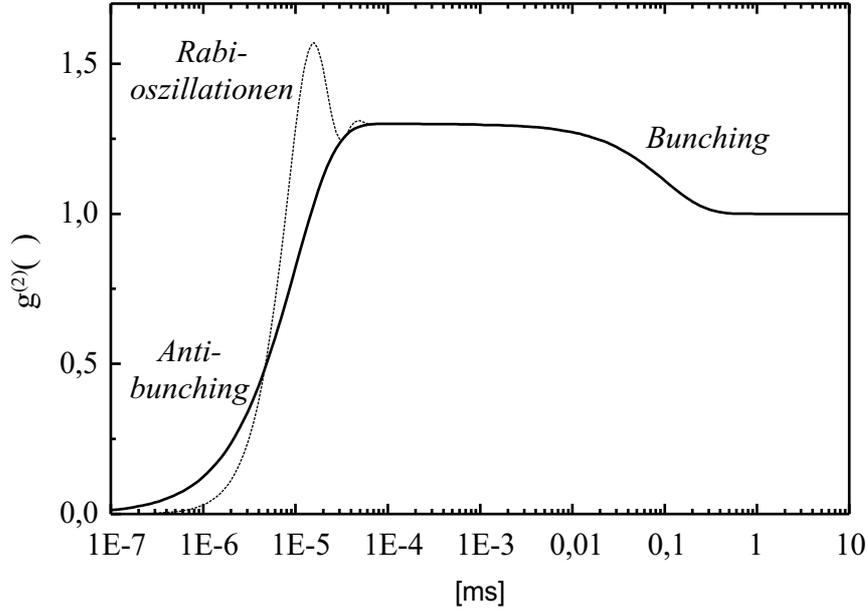


Abbildung 3.3: Graph der Korrelationsfunktion des Fluoreszenzlichts einzelner Moleküle für inkohärenter Anregung (durchgezogene Linie, nach Gl. 3.21 mit typischen Raten in den Exponenten von 100 MHz und 10 kHz) und für kohärente Anregung (gestrichelte Linie, Rabi-Frequenz $\Omega = 200$ MHz). Die Zeitachse ist logarithmisch skaliert.

sich das System im Triplettzustand befindet. Aus dem Faktor vor der Exponentialfunktion (Kontrast C) und der Rate im Exponenten kann auf die Raten in den Dunkelzustand und und aus ihm heraus geschlossen werden. Dabei gilt allgemein, dass die Rate im Exponenten die Summe K der (effektiven) Raten in und aus dem Dunkelzustand ist und der Kontrast C ihr Verhältnis. Da in direkten Korrelationsmessungen die Zeitauflösung nicht für die Beobachtung von Antibunching ausreicht, soll dieser Effekt in der letzten Formulierung der Korrelationsfunktion auch vernachlässigt werden. Für Zeiten $\tau > 100$ ns gilt dann:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{k_{23}^{eff}}{k_{31}} e^{-(k_{23}^{eff} + k_{31})\tau} = 1 + C e^{-K\tau} \quad (3.22)$$

mit

$$C = \frac{k_{23}^{eff}}{k_{31}} \quad \text{und} \quad K = k_{23}^{eff} + k_{31}. \quad (3.23)$$

Die absoluten Triplett-raten k_{23} und k_{31} können durch intensitätsabhängige Messungen aus den Kontrasten C und den Ratensummen K gewonnen werden:

$$\begin{aligned}
C &= \frac{k_{23}}{k_{31}} \frac{p}{k_{21} + 2p} = \frac{k_{23}}{k_{31}} \frac{I}{I'_S + 2I} \\
K &= k_{31} + k_{23} \frac{p}{k_{21} + 2p} = k_{31} + k_{23} \frac{I}{I'_S + 2I}
\end{aligned} \tag{3.24}$$

Die Sättigungsintensität I'_S ist hier definiert als $I'_S = k_{21} \hbar^2 \varepsilon_0 c / (T_2 \mu_{12}^2)$ (bei resonanter Anregung in Tieftemperaturexperimenten) bzw. $I'_S = k_{21} h \nu / \sigma$ (bei Raumtemperatur). Aus dem Kontrast allein lässt sich nur das Ratenverhältnis bestimmen. Die intensitätsabhängige Bestimmung der Ratensumme, also der jeweils auftretenden Zerfallsrate der Exponentialfunktion in $g^{(2)}(\tau)$, liefert die beiden absoluten Triplett-raten. Für niedrige Intensitäten strebt die Zerfallsrate K gegen die Triplettentvölkerungsrate k_{31} , die der Kehrwert der mittleren Triplettlebensdauer τ_T ist; für hohe Intensitäten strebt sie gegen $k_{31} + \frac{1}{2}k_{23}$, woraus sich die Triplettbevölkerungsrate k_{23} ermitteln lässt (Kapitel 5.1.4, Abb. 5.5).

In der Realität ist die Messung der Fluoreszenzintensität zur Berechnung der Korrelationsfunktion immer von einem Untergrundbeitrag begleitet. Dies führt zu einer Änderung der Kontraste C_{exp} in der experimentell bestimmten Funktion $g_{exp}^{(2)}(\tau) = 1 + C_{exp} e^{-K\tau}$. Führt man die in der Korrelationsfunktion auftretende Mittelung für eine Intensität durch, die sich aus Untergrund U und Signal S zusammensetzt, so erhält man: $\langle [U+S](t)[U+S](t+\tau) \rangle = \langle U(t) \rangle^2 + 2\langle U(t) \rangle \langle S(t) \rangle + \langle S(t) \rangle^2 (1 + C e^{-K\tau})$. Dabei wurde ausgenutzt, dass der Untergrund unkorreliert ist ($\langle U(t)U(t+\tau) \rangle = \langle U(t) \rangle^2$, $\langle U(t)S(t+\tau) \rangle = \langle U(t) \rangle \langle S(t) \rangle$) und die Korrelationsfunktion für das Signal gleich eingesetzt. Teilt man durch den Normierungsausdruck $\langle U(t) + S(t) \rangle^2 = (\langle U(t) \rangle + \langle S(t) \rangle)^2$, so findet man die Beziehung zur Korrektur des experimentellen Kontrasts bei Auftreten eines mittleren Signals $\langle S \rangle$ neben dem mittleren Untergrund $\langle U \rangle$:

$$C = \left(1 + \frac{\langle U \rangle}{\langle S \rangle} \right)^2 C_{exp}. \tag{3.25}$$

Die Werte $\langle U \rangle$ und $\langle S \rangle$ müssen zusätzlich zur Korrelationsfunktion bestimmt werden. Zur Anpassung der theoretischen Korrelationsfunktion an die experimentellen Daten für die verschiedenen Intensitäten kann eine der Darstellungen der Korrelationsfunktion in Gl. 3.22, wahlweise mit den Parametern k_{31} und k_{32}^{eff} oder mit C und K , verwendet werden.

3.2 Dynamische Einflüsse auf die homogene Linie

In Tieftemperaturexperimenten hat man über die Linienform der einzelnen, eingelagerten Moleküle einen idealen Zugang zur Untersuchung von dynamischen Prozessen in dem Festkörper. Die Farbstoffe dienen dabei als Sonden zur Charakterisierung ihrer individuellen Umgebung.

Die Tieftemperatureigenschaften von Kristallen, mit ihrer regelmäßigen räumlichen Anordnung, sind gut verstanden. Ihre Beschreibung ist auf quantisierten Gitterschwingungen, Phononen, begründet und liefert z.B. im Rahmen der Debye-Theorie bei tiefen Temperaturen zufriedenstellende Vorhersagen für die spezifische Wärmekapazität ($C \propto T^3$) oder die Wärmeleitfähigkeit. Ein geeignetes Modell zur Beschreibung der Tieftemperatureigenschaften von ungeordneten, amorphen Festkörpern, bei denen der Ansatz mit Phononen versagt, gelang durch Einführung des Modells des *Two-Level System* (TLS), das 1972 unabhängig von P. W. Anderson et al. [109] und W. A. Phillips [110] vorgeschlagen wurde.

3.2.1 Das TLS-Modell

Die fehlende Fernordnung in amorphen Festkörpern hat zur Folge, dass viele Atome und Atomgruppen keine eindeutige Gleichgewichtslage einnehmen, sondern zwischen zwei oder mehreren instabilen, lokalen Gleichgewichtspositionen wechseln können. Die Potentialhyperfläche als Funktion der $3N$ elementaren Freiheitsgrade ist gekennzeichnet durch eine unregelmäßige Struktur mit vielen lokalen Minima, die durch Barrieren getrennt sind. Ein globales Minimum tritt nicht auf. Ein Schnitt durch eine solche Potentialhyperfläche ist in Abb. 3.4 dargestellt.

Die dem TLS-Modell zugrundeliegende Idee besteht darin, die komplexe Potentialhyperfläche in viele einzelne Doppelmuldenpotentiale zu zerschneiden. Jedes einzelne TLS stellt eine Kopplung von zwei harmonischen Potentialen dar und ist gekennzeichnet durch seinen Energieunterschied ΔE , die Barrierenhöhe V und die Auslenkung in der Ortskoordinate d . Bei tiefen Temperaturen reicht die thermische Aktivierung im Allgemeinen nicht aus, um den Potentialberg zu überwinden. Übergänge zwischen den beiden Zuständen treten durch Tunnelprozesse auf, die zum Ausgleich des Energieunterschieds Phononenbeteiligung erfordern (*phonon-assisted tunneling*). Die verschiedenen auftretenden Mechanismen sind in [111] behandelt.

Für die Eigenschaften des Festkörpers sind die Verteilungen der Energieunterschiede ΔE und der Tunnelparameter λ wesentlich. Der Tunnelparameter ist definiert durch $\lambda = \sqrt{\frac{mVd^2}{2\hbar^2}}$ mit der Masse m des tunnelnden Teilchens. Die Verteilungen werden im

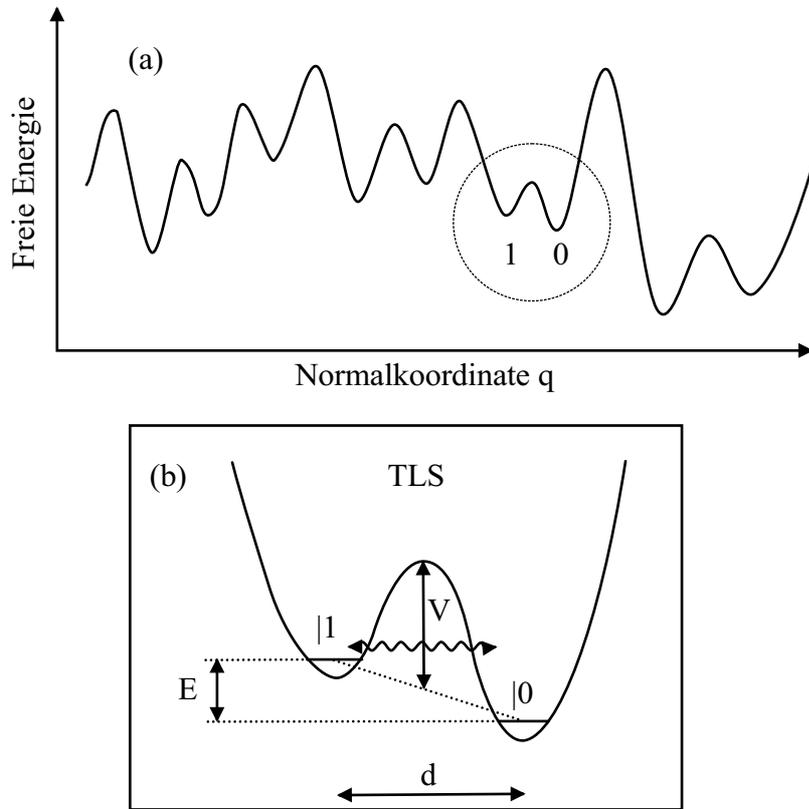


Abbildung 3.4: (a) Schnitt durch die Potentialhyperfläche der freien Energie eines amorphen Festkörpers. Die vielen lokalen Minima werden paarweise durch *Two-Level Systems* dargestellt. (b) Bestimmungsgrößen eines TLS.

TLS-Modell als flach angenommen, d.h. TLS mit verschiedenen Energieunterschieden und verschiedenen Tunnelparametern treten zwischen physikalisch sinnvollen Grenzen im Wesentlichen gleich häufig auf:

$$P(\Delta E, \lambda) \cong \text{konst.} \quad (3.26)$$

Zur Anpassung der Theorie an Messdaten aus Lochbrennexperimenten wurde die Verteilung zu $P(\Delta E) \propto E^{\alpha-1}$ mit α zwischen 1 und 2 abgewandelt [112]. Eine weitere wichtige Größe ist die charakteristische Relaxationsrate R der TLS-Dynamik ($R = k_{01} + k_{10}$ sei die Summe der Raten von einem in das andere Minimum). Die entsprechenden Relaxationszeiten sind über einen riesigen Bereich von bis zu 20 Größenordnungen, von ps ($R_{max} = 10^{12}\text{s}^{-1}$) bis zu Jahren ($R = 10^{-8}\text{s}^{-1}$), verteilt. Die Verteilung ist mit geringen Einschränkungen indirekt proportional zur Rate:

$$P(R) \propto \frac{1}{R} \quad (3.27)$$

(Detailliertere Informationen können der Arbeit von H. W. Augustin entnommen werden [75].) Die erfolgreiche Anwendung des TLS-Modells blieb nicht auf die Erklärung thermodynamischer Eigenschaften beschränkt, sondern führte auch zu einem wesentlich besseren Verständnis der Linienbreiten molekularer Übergänge in Tieftemperaturexperimenten.

3.2.2 Spektrale Diffusion

Der Flip eines TLS hat direkte Auswirkungen auf die Absorptionsbande eines einzelnen Moleküls. Die durch den TLS-Übergang geänderte Umgebung führt zu einer neuen, verschobenen Absorptionsfrequenz. Die Absorptionslinie des Moleküls wandert im Frequenzraum. Unter dem Einfluss vieler TLS kommt eine diffusionsartige Bewegung der Linie zustande, die zu dem Namen spektrale Diffusion geführt hat.

Für den Effekt auf das Spektrum sind zwei Parameter wichtig: die Stärke der Verschiebung und die TLS-Fliprate K . Man differenziert zwischen Raten, die im Vergleich zur (inversen) Aufnahmezeit τ_{exp} eines Spektrums langsam sind, so dass der TLS-Zustand sich während der Aufnahme nicht ändert und gleichsam eingefroren ist, und Raten, die schnell sind, so dass bei der Spektrenaufnahme über beide Zustände gemittelt wird. Ist die spektrale Verschiebung durch die TLS-Zustandsänderung groß im Vergleich zur Linienbreite und die Fliprate langsam, so sieht man im Spektrum die Linie entweder bei der einen oder der anderen Position. Ein Beispiel für einen spektralen Sprung eines Perylenmoleküls in Polyethylen ist in Abb. 3.5 dargestellt. Häufig sind solche TLS-Zustandsänderungen induziert durch das Anregungslicht als Folge der im System deponierten Energie.

Ist bei großer spektraler Verschiebung die Sprungrate groß, so sieht man zwei Linien im Spektrum (Abb. 3.6 a). Ihr Intensitätsverhältnis ist (für thermisch aktivierte Prozesse) durch die Boltzmann-Verteilung gegeben:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (3.28)$$

Im Falle eines schnellen Austausches und bei einer gegenüber der Linienbreite kleinen Verschiebung sieht man effektiv eine Verbreiterung der Linie, weil die einzelnen Positionen nicht mehr aufgelöst werden und ineinander verschwimmen (Abb. 3.6 b). Die geringe Verschiebung kann durch eine kleine TLS-Chromophor-Kopplungskonstante oder durch einen großen Abstand des Moleküls vom TLS begründet sein.

Noch komplizierter wird die Interpretation der Linienform bei der Wechselwirkung eines Moleküls mit vielen TLS. Dabei sind beliebige Multipeak-Strukturen denkbar

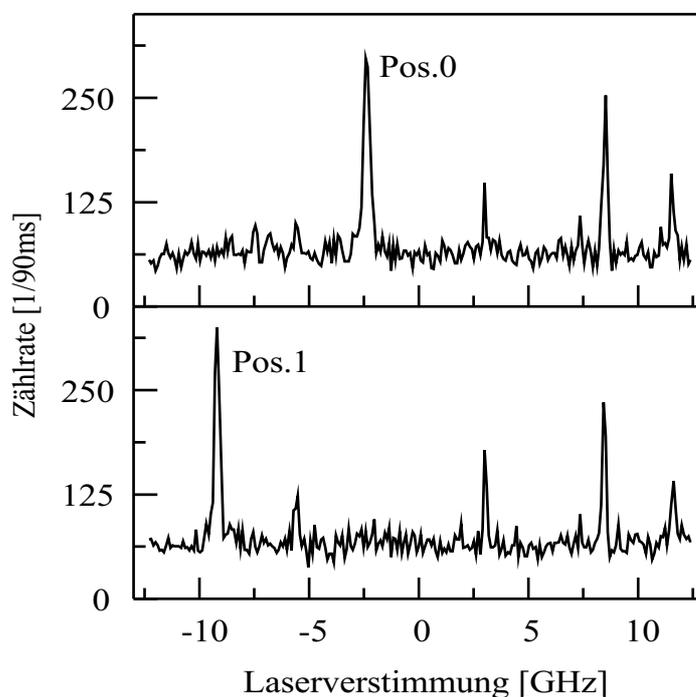


Abbildung 3.5: Spektrale Diffusion in Fluoreszenzanregungsspektren von Perylen in Polyethylen ($0 \text{ GHz} \equiv 443,6 \text{ nm}$) durch ein langsam flippendes TLS ($K < 1/\tau_{exp}$).

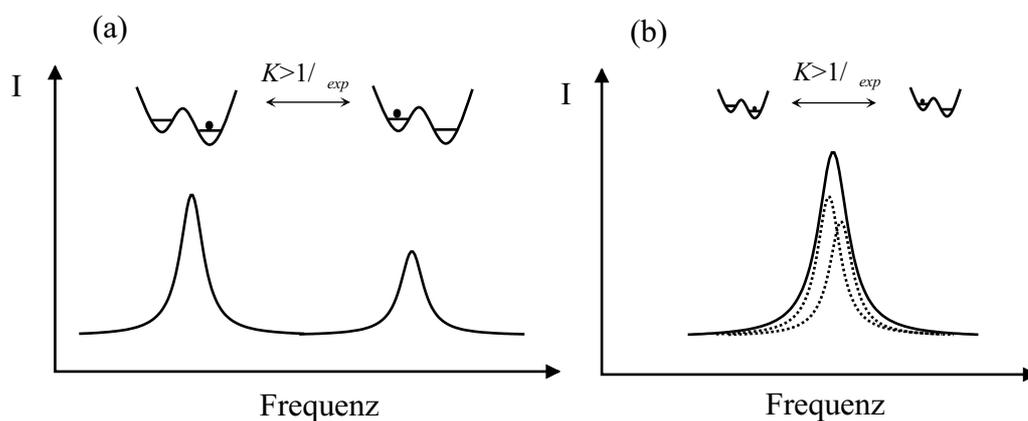


Abbildung 3.6: Veranschaulichung der (a) Linienaufspaltung und (b) Linienverbreiterung durch Wechselwirkung des Moleküls mit einem schnell flippenden TLS. Die geringere Größe der TLS in (b) soll die geringere Wechselwirkung zwischen Molekül und TLS veranschaulichen, die durch eine kleine TLS-Chromophor-Kopplungskonstante oder durch einen großen Abstand des Moleküls vom TLS verursacht sein kann.

und auch schon simuliert worden [113]. Unter den experimentellen Bedingungen wurden jedoch meist lorentzähnliche Linienformen gefunden und auch in der Literatur sind nur wenige Systeme bekannt, deren Anregungsspektren eine Doppelpeakstruktur zeigen [15, 111]. Diese ist dann verursacht durch ein einzelnes TLS. Am System Tetra-tert-Butylterrylen in Polyisobutylene konnte die Wechselwirkung eines Chromophors mit nur einem TLS sogar temperaturabhängig untersucht werden und es konnten die Flipraten und die Aufspaltungsenergie des TLS bestimmt werden [111].

Der Effekt der spektralen Diffusion wurde bereits bei den ersten Einzelmolekülexperimenten beobachtet [14]. Erstaunlicherweise trat er in dem kristallinen System Pentacen in *para*-Terphenyl auf. Die Erklärung konnten Reilly und Skinner [114] mit einem mikroskopischen Bild für diese TLS liefern: Für den mittleren Phenylring der Matrixmoleküle gibt es zwei bevorzugte Lagen, die durch ein TLS modelliert werden können. An Domänengrenzen und Fehlstellen im Kristall ist die Barriere klein genug, um selbst bei den tiefen Temperaturen durchtunnelt zu werden.

3.2.3 Linienbreitenverteilungen

Die Kopplung einzelner Chromophore an individuelle TLS-Konfigurationen führt, wie im letzten Abschnitt beschrieben, zu unterschiedlichen Linienformen. Insbesondere zeigt die Linienbreite der einzelnen Moleküle eine Verteilung, so dass man streng genommen gar nicht von homogenen Linien sprechen darf. Zur theoretischen Beschreibung der Linienbreitenverteilung eignen sich zwei Ansätze. Der eine ist eine numerische Simulation der spektralen Diffusion [113], der andere ist ein analytischer Ansatz [115] basierend auf der statistischen Methode nach Stoneham [116]. Hier soll die zweite Methode verwendet werden.

Man nimmt an, dass jedes Molekül von einem speziellen Satz von TLS umgeben ist. Zur Linienverbreiterung tragen nur solche TLS bei, deren Relaxationsrate K größer ist als die inverse Zeit zur Spektrenaufnahme $1/\tau_{exp}$. Alle Übrigen sind quasi eingefroren und damit nicht sichtbar. Darüber hinaus interessieren nur TLS, deren Zustandswechsel zu einer Linienverschiebung höchstens in der Größenordnung der Linienbreite liegt. Um eine Aufspaltung der Linie, deren Weite mit zunehmendem Abstand zwischen Molekül und TLS abnimmt, auszuschließen, dürfen dementsprechend nur TLS außerhalb einer Kugel mit Radius r_{min} um den Chromophor auftreten (siehe Abb. 3.7). Die Linienform bleibt im Fall einer Verschiebung, die so gering ist, dass sie nur zu einer Verbreiterung führt, näherungsweise lorentzförmig. Die Kopplung der TLS untereinander soll vernachlässigt werden, so dass sie als statistisch voneinander unabhängig betrachtet werden können. Die absolute Linienverschiebung durch ein TLS hängt nun von der Kopplung dieses TLS an den elektronischen

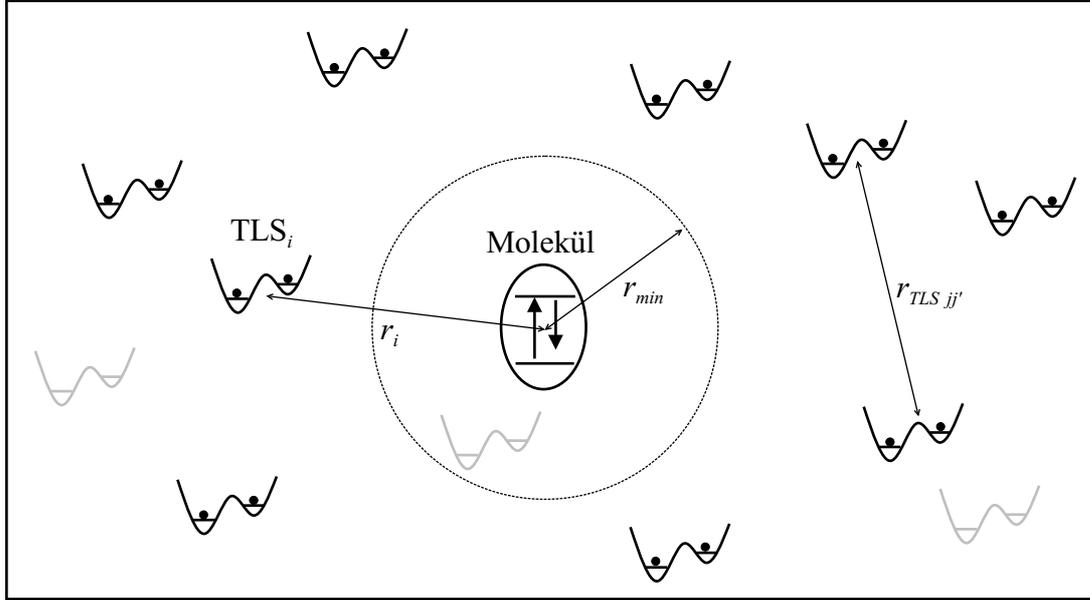


Abbildung 3.7: Anschauliche Vorstellung der Verteilung von TLS um ein Molekül. Die individuelle Konfiguration von TLS außerhalb einer Kugel mit Radius r_{min} um ein Molekül führt zu einer von Molekül zu Molekül verschiedenen Verbreiterung.

Übergang des Moleküls ab. Die Wechselwirkung sei dipolar, so dass die Verschiebung indirekt proportional zur dritten Potenz des Molekül-TLS-Abstands r_i ist. Die Linienverschiebung für Moleküle im Abstand r_{min} sei 2Λ . Dieser Wert sei für alle TLS identisch und eine Winkelabhängigkeit in einem effektiv kleineren mittleren Λ genähert. Die Richtung ist unbedeutend, da verschiedene Vorzeichen zur gleichen Verbreiterung führen. Schließlich gilt für die Zentralfrequenz der molekularen Absorption in Abhängigkeit der mittleren Absorptionsfrequenz $\langle\nu(t)\rangle$ und des Zustands $\epsilon_i = \pm 1$ des i -ten der N TLS:

$$\nu(t) = \langle\nu(t)\rangle + \sum_{i=1}^N \epsilon_i(t) \Lambda \frac{r_{min}^3}{r_i^3} \quad (3.29)$$

Die Linienbreite eines solchen Moleküls bei Kopplung an diese N TLS ist dann gegeben durch:

$$\Delta\nu = \sqrt{\Delta\nu_0 + 4\Lambda^2 \sum_{i=1}^N \frac{r_{min}^6}{r_i^6}} \quad (3.30)$$

Dies lässt sich verstehen, wenn man zunächst nur die Kopplung an ein einzelnes TLS betrachtet. Es führt zur Aufspaltung in zwei lorentzförmige Linien bei Positionen,

die um $v_{1\pm} = \pm \Lambda \frac{r_{min}^3}{r_1^3}$ relativ zum Mittel $\langle \nu(t) \rangle$ verschoben sind und die minimale Linienbreite $\Delta\nu_0$ haben ($|v_1| < \Delta\nu_0$). Addiert man die beiden Linien, erhält man näherungsweise eine Lorentzkurve um $\langle \nu(t) \rangle$ mit der Breite $\sqrt{\Delta\nu_0^2 + (2v)^2}$. Bezieht man sukzessiv die weiteren TLS ein, liefert jedes einen Beitrag unter der Wurzel entsprechend zu $(2v_i)^2$ und man erhält Formel 3.30. Die in der Verteilung minimale auftretende Linienbreite ist $\Delta\nu_0$, das Maximum der Verteilung wird bei einer etwas höheren Breite sein, und nach oben ist die Verteilung prinzipiell nicht beschränkt, fällt aber gegen Null ab.

Die Berechnung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Linienbreiten $P(\Delta\nu)$ kann man reduzieren auf die Berechnung der Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(S)$ für die in (3.30) auftretende Summe S :

$$S = \sum_{i=1}^N \frac{r_{min}^6}{r_i^6}. \quad (3.31)$$

Die beiden Verteilungen können wegen $P(\Delta\nu)d(\Delta\nu) = P(S)dS$ und $\frac{d(\Delta\nu)}{dS} = \frac{2\Lambda^2}{\Delta\nu}$ leicht ineinander umgerechnet werden:

$$P(\Delta\nu) = \frac{\Delta\nu}{2\Lambda^2} P(S) \quad (3.32)$$

Die Verteilung $P(S)$ soll nun mit der statistischen Methode berechnet werden [116]. Die N TLS (N sei abzählbar groß) sind statistisch im Volumen V verteilt. Damit ist die TLS-Dichte $\rho_{TLS} = \frac{N}{V}$ und der mittlere TLS-Abstand r_{TLS} gegeben durch $\rho_{TLS} = 1/r_{TLS}^3$. Die Wahrscheinlichkeit, dass das i -te TLS im Volumenelement $d^3\vec{r}_i$ um \vec{r}_i liegt, sei $p(\vec{r}_i) \frac{1}{V} d^3\vec{r}_i$. Zur Normierung gilt $\int p(\vec{r}_i) d^3\vec{r}_i = V$ und wegen der Zufallsverteilung ist $p(\vec{r}_i)$ im Außenraum der Kugel mit Radius r_{min} gleichverteilt: $p(\vec{r}_i) d^3\vec{r}_i = r_i^2 \sin\vartheta dr_i d\vartheta d\varphi$ für alle $r_i > r_{min}$ und 0 sonst. Die Erfüllung der Wahrscheinlichkeitsbedingung $S = \sum_{i=1}^N \frac{r_{min}^6}{r_i^6}$ wird im Ansatz über die Diracsche δ -Funktion (bzw. δ -Distribution) gewährleistet, die Null ist, falls ihr Argument von Null verschieden ist, und an der Stelle Null so groß ist, dass das Integral darüber Eins ist. Der Ansatz lautet:

$$P(S) = \frac{1}{V^N} \int d^3\vec{r}_1 p(\vec{r}_1) \cdots \int d^3\vec{r}_N p(\vec{r}_N) \delta\left(S - \sum_{i=1}^N \frac{r_{min}^6}{r_i^6}\right) \quad (3.33)$$

In diesem Ausdruck wird die Wahrscheinlichkeit für ein beliebiges S berechnet, indem über alle möglichen TLS-Verteilungen, die zu diesem S führen, integriert

wird (die Integrale verstehen sich als Volumenintegrale über den ganzen Raum). Im Weiteren werden einige mathematische Umformungen durchgeführt, die zur leichteren Nachvollziehbarkeit in den wichtigsten Schritten hier dargestellt werden sollen. Zunächst wird die δ -Funktion in ihrer Fourier-Darstellung verwendet, $\delta(z) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-ixz} dx$, anschließend die Integrationsreihenfolge vertauscht und die Summe im Exponenten in ein Produkt von Exponentialfunktionen überführt.

$$P(S) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dx \left(e^{-ixS} \cdot \prod_{i=1}^N \left(\frac{1}{V} \int d^3\vec{r}_i p(\vec{r}_i) e^{ix \frac{r_{min}^6}{r_i^6}} \right) \right) \quad (3.34)$$

Da für alle TLS die Verhältnisse identisch sind, sind auch alle Faktoren des Produkts gleich. Es genügt daher, einen Faktor (ohne weitere Verwendung des Index i) in der N -ten Potenz zu schreiben. Unter Ausnutzung der Normierungsbedingung, Verwendung der TLS-Dichte und Definition von

$$J(x) := \int d^3\vec{r} p(\vec{r}) \left(1 - e^{ix \frac{r_{min}^6}{r^6}} \right) = 4\pi \int_{r_{min}}^{\infty} dr r^2 \left(1 - e^{ix \frac{r_{min}^6}{r^6}} \right) \quad (3.35)$$

erhält man:

$$P(S) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dx \left(e^{-ixS} \cdot \left(1 - \frac{\rho_{TLS} J(x)}{N} \right)^N \right) \quad (3.36)$$

$J(x)$ ist dabei eine komplexwertige Funktion, auf die später noch genauer eingegangen werden muss. Der Ausdruck für $P(S)$ lässt sich für große N (und entsprechend großem Volumen V , so dass ρ_{TLS} konstant ist) unter Ausnutzung der Beziehung $e^z = \lim_{N \rightarrow \infty} \left(1 + \frac{z}{N} \right)^N$ schließlich umformen in:

$$P(S) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dx \left(e^{-ixS} \cdot e^{-\rho_{TLS} J(x)} \right) \quad (3.37)$$

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung lässt sich damit numerisch berechnen. Das Auftreten des uneigentlichen Integrals $J(x)$ innerhalb eines weiteren uneigentlichen Integrals führt dabei jedoch zu Problemen. Deshalb wird $J(x)$ noch verändert. Durch Variablensubstitution $u := \frac{r_{min}^6}{r^6}$ erhält man

$$J(x) = \frac{2\pi}{3} r_{min}^3 \int_0^1 du \frac{1 - e^{ixu}}{u^{\frac{3}{2}}} =: r_{min}^3 \tilde{J}(x). \quad (3.38)$$

Das darin auftretende Integral (inklusive des konstanten Vorfaktors) $\tilde{J}(x) = \frac{2\pi}{3} \int_0^1 du u^{-\frac{3}{2}} (1 - e^{ixu})$ wird weiter in den bezüglich x symmetrischen Realteil $\text{Re}(\tilde{J}(x)) = \frac{2\pi}{3} \int_0^1 du u^{-\frac{3}{2}} (1 - \cos xu)$ und in den bezüglich x antisymmetrischen Imaginärteil $\text{Im}(\tilde{J}(x)) = \frac{2\pi}{3} \int_0^1 du u^{-\frac{3}{2}} (-\sin xu)$ zerlegt (mit der Eulerschen Formel $e^{ix} = \cos x + i \sin x$), einzeln berechnet (siehe Abb. 3.8) und stückweise durch Polynome maximal dritten Grades angepasst:

$$\text{Re}(\tilde{J}(x)) = \begin{cases} +0,59x^2 & \text{für } 0 \leq x < 2,5 \\ -6,3 + 5,3x - 0,66x^2 + 0,031x^3 & \text{für } 2,5 \leq x < 10 \\ +4,9 + 0,83x - 59 \cdot 10^{-4}x^2 & \text{für } 10 \leq x < 40 \\ +12 + 0,49x - 12 \cdot 10^{-4}x^2 & \text{für } 40 \leq x < 10^2 \\ +27 + 0,25x - 19 \cdot 10^{-5}x^2 + 73 \cdot 10^{-9}x^3 & \text{für } 10^2 \leq x < 10^3 \\ +111 + 0,061x - 2,1 \cdot 10^{-6}x^2 & \text{für } 10^3 \leq x < 10^4 \end{cases}$$

$$\text{Im}(\tilde{J}(x)) = \begin{cases} -4,2x + 0,11x^3 & \text{für } 0 \leq x < 2,5 \\ -5 - 1,9x + 0,15x^2 - 84 \cdot 10^{-4}x^3 & \text{für } 2,5 \leq x < 10 \\ -9,1 - 0,83x + 59 \cdot 10^{-4}x^2 & \text{für } 10 \leq x < 40 \\ -16 - 0,48x + 12 \cdot 10^{-4}x^2 & \text{für } 40 \leq x < 10^2 \\ -31 - 0,25x + 19 \cdot 10^{-5}x^2 - 72 \cdot 10^{-9}x^3 & \text{für } 10^2 \leq x < 10^3 \\ -111 - 0,061x + 21 \cdot 10^{-7}x^2 & \text{für } 10^3 \leq x < 10^4 \end{cases}$$

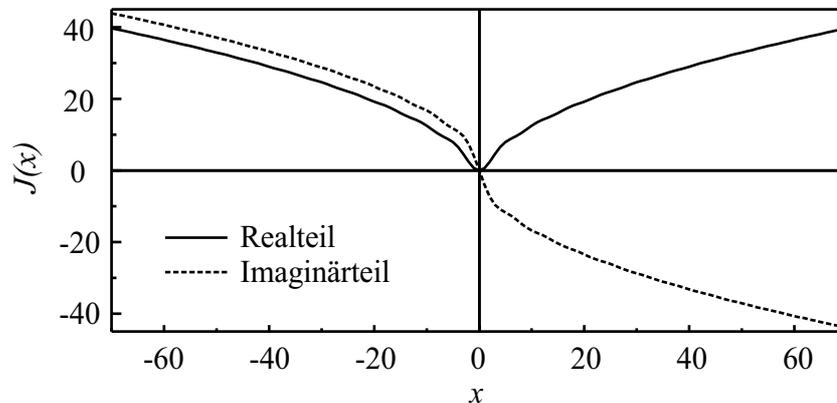


Abbildung 3.8: Graphen von Real- und Imaginärteil der Funktion $\tilde{J}(x)$ aus numerischer Berechnung.

Aus den Symmetrieeigenschaften ergeben sich die Werte für negative x . Da die Funktion $\text{Re}(\tilde{J}(x))$ negativ im reellen Exponenten vorkommt, tragen besonders die kleinen Funktionswerte zum Ergebnis bei. Deshalb wurde die Approximation für kleine x besonders sorgfältig gewählt und für $|x| > 10000$ völlig vernachlässigt. Die

Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(S)$ kann nun unter Ausnutzung von Symmetrieeigenschaften zu

$$P(S) = \frac{1}{\pi} \int_0^{+\infty} dx \left(\cos \left(x S + \frac{r_{min}^3}{r_{TLS}^3} \text{Im}(\tilde{J}(x)) \right) \cdot e^{-\frac{r_{min}^3}{r_{TLS}^3} \text{Re}(\tilde{J}(x))} \right) \quad (3.39)$$

angegeben werden. In dieser Form konnte $P(S)$ mit *Mathematica* (Wolfram Research, Inc.) berechnet werden. Die Konvergenz des uneigentlichen Integrals ist meist schon für $x < 1000$ gegeben. Trotzdem treten für einzelne Punkte gelegentlich Fehlerwerte auf, die jedoch innerhalb der Verteilung erkannt und ausgeschlossen werden können. Eine sinnvolle Verteilung mit Fläche ≈ 1 wird als Entscheidungskriterium zur Kontrolle der numerischen Berechnungen verwendet.

Mit (3.32) und (3.30) lässt sich nun für $P(\Delta\nu)$ zusammenfassen:

$$P(\Delta\nu) = \frac{\Delta\nu}{2\Lambda^2} P(S) \quad (3.40)$$

$$\text{mit } \begin{cases} \Delta\nu = \sqrt{\Delta\nu_0 + 4\Lambda^2 S} \\ P(S) = \frac{1}{\pi} \int_0^{+\infty} dx \left(\cos(x S + v_r^3 \text{Im}\tilde{J}) \cdot e^{-v_r^3 \text{Re}\tilde{J}} \right) \\ \text{und } v_r = \frac{r_{min}}{r_{TLS}} \end{cases}$$

In Abb. 3.9 sind mehrere dieser Verteilungen dargestellt. Zu ihrer Berechnung wurde als minimale Linienbreite $\Delta\nu_0 = 40$ MHz, der Kopplungsparameter $\Lambda = 100$ MHz, der minimal erlaubte TLS-Molekül-Abstand $r_{min} = 5$ nm gewählt und der mittlere TLS-Abstand r_{TLS} zwischen 5 nm (hohe TLS-Dichte, weite Verteilung) und 15 nm (geringe TLS-Dichte, schmale Verteilung) variiert. Für geringe TLS-Dichten ergibt sich eine stark asymmetrische Kurve, die ihr Maximum nur knapp über der ungestörten natürlichen Linienbreite $\Delta\nu_0$ hat. Für höhere TLS-Dichten erstreckt sich die Verteilung immer mehr in den Bereich höherer Linienbreiten und geht in eine gaußähnliche Verteilung über.

Die Verteilung $P(\Delta\nu)$ hängt effektiv nur von zwei Parametern ab: vom Kopplungsparameter Λ , der typischerweise in der Größenordnung der minimalen Linienbreite $\Delta\nu_0$ liegen sollte, und vom Verhältnis $v_r = \frac{r_{min}}{r_{TLS}}$. Für sinnvolle Verteilungen sollte dieses Verhältnis kleiner als 1 sein, damit die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass ein TLS in der Nähe des Moleküls bzw. innerhalb der Kugel vom Radius r_{min} liegt.

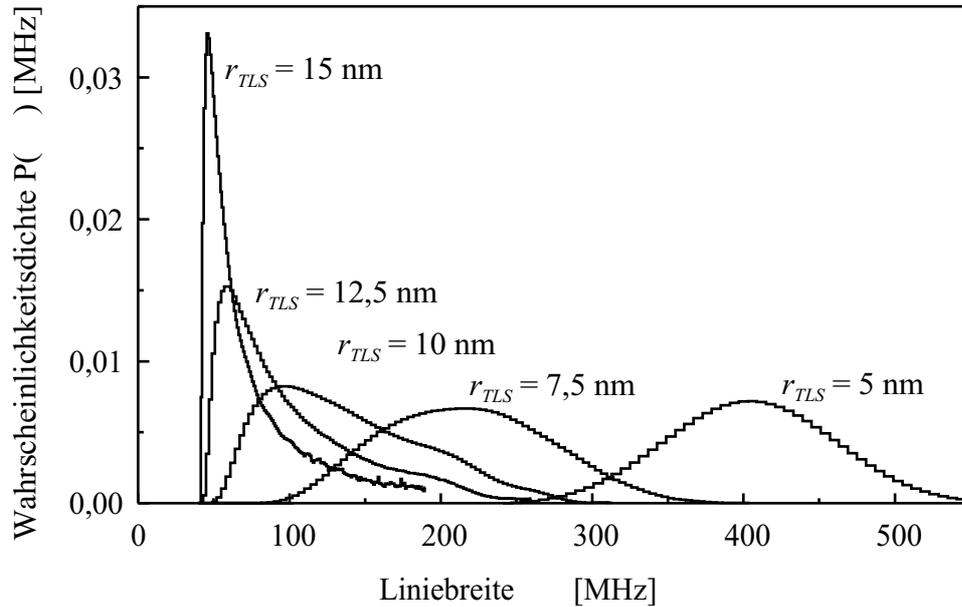


Abbildung 3.9: Linienbreitenverteilungen für verschiedene TLS-Dichten $\frac{1}{r_{TLS}^3}$ für die im Text genannten Parameter.

Die absolute TLS-Dichte kann aus angepassten Verteilungen nur angegeben werden, wenn r_{min} bekannt ist. Dies kann nur abgeschätzt werden. Als sinnvolle Größenordnung ist der Bereich um 5 nm anzugeben, weil hier die TLS Wirkungen klein genug sind, um Linienaufspaltung zu vermeiden, die dipolare Kopplung aber noch für eine messbare Wechselwirkung ausreicht. In der gewonnenen TLS-Dichte zählen nur TLS, die auf der experimentellen Zeitskala aktiv sind.

3.2.4 Temperaturabhängigkeit von Linienbreite und Linienposition

Das Auftreten von niederfrequenten Anregungszuständen in der Matrix führt schon bei sehr tiefen Temperaturen von etwa 2 K zu Veränderungen von Linienbreite und Frequenz des molekularen Übergangs. Im unteren Temperaturbereich liefern die schon in den letzten Abschnitten behandelten TLS den dominanten Beitrag, da durch die breite Verteilung an Energieunterschieden ΔE und Kopplungsstärken auch in diesem Bereich viele TLS aktiv sind. Bei höheren Temperaturen nimmt der Beitrag durch Phononen an Bedeutung zu. Man unterscheidet zwischen akustischen, optischen und pseudolokalen Phononen. Die ersten beiden Arten spielen besonders bei substitutioneller Ersetzung eines Wirtsmoleküls durch ein Farbstoffmolekül in einkristallinen Systemen eine Rolle. Im vorliegenden Fall stellt die Dotie-

rung mit dem Chromophor eine beträchtliche Störung des Wirtsgitters dar, so dass es durch Wechselwirkung der Schwingungsmode des Dotierungsmoleküls mit der Gitterschwingung zu einer pseudolokalen Mode kommt. Da die Phononenbesetzung der Bose-Einstein-Verteilung

$$n(T) = \frac{1}{e^{\frac{\hbar\omega}{k_B T}} - 1} \quad (3.41)$$

mit der Energie $\hbar\omega$ des Phonons genügt, nimmt die Besetzungszahl und damit der Beitrag zur Linienform mit der Temperatur rasch zu. In der Einzelmolekülspektroskopie hat man neben der Linienbreite auch direkten Zugang zur Linienposition. In den folgenden beiden Abschnitten soll nun der Effekt von TLS und pseudolokalen Phononen auf diese beiden Parameter bei Temperaturerhöhung beschrieben werden. Im theoretischen Ansatz zur Linienverschiebung muss neben den erwähnten dynamischen Beiträgen auch noch der statische Beitrag infolge von Volumenexpansion betrachtet werden.

Kopplung an TLS

Die Kopplung von TLS an einen molekularen Übergang von Farbstoffen in Gläsern wurde in vielen Lochbrennexperimenten untersucht. Die Temperaturabhängigkeit der Linienbreite genügt allgemein der Gleichung

$$\Delta\nu_{hb}(T) = \Delta\nu_{hb_0} + a_w T^\alpha \quad (3.42)$$

mit der minimalen Linienbreite $\Delta\nu_{hb_0}$ (vgl. Kapitel 2.1), einem Faktor a_w (w für *width*) und dem Exponenten α , der in Experimenten für verschiedene Gläser und auch für verschiedene Gastmoleküle zwischen 1 und 2 streute. Allein aus dem TLS-Modell unter Annahme konstanter Energiebarrieren(ΔE)- und Tunnelparameter(λ)-Verteilungen sowie dipolarer Kopplung erwartet man $\alpha = 1$ [117]. Durch Abwandlung der Annahmen für die Verteilungsfunktionen konnten auch die anderen Koeffizienten α (insbesondere $\alpha = 1,3$) in der Formel für die Temperaturabhängigkeit erklärt werden.

Durch die Kopplung an einen bestimmten Satz an TLS kann es bei Einzelmolekülexperimenten jedoch zu un stetigen Abweichungen bei der gemessenen Linienbreite kommen. Diese sind verursacht durch die plötzliche Aktivierung eines TLS und die damit verbundene sprunghafte Verbreiterung. Diese Effekte konnten in numerischen Simulationen gezeigt werden [118], sind aber analytisch nicht zu erfassen.

Für die Linienverschiebung gibt es keine analytische Theorie. In erster Näherung erwartet man, dass sich die Beiträge zu höherer und niederer Frequenz ausgleichen und im Mittel keine Verschiebung auftritt. Um der unzureichenden Statistik bei der Mittelung innerhalb nur einer TLS-Konfiguration und Inhomogenitäten durch die mögliche Lage des Moleküls an Extrempositionen der inhomogenen Verbreiterung Rechnung zu tragen, soll die Temperaturabhängigkeit der Frequenzverschiebung δ_s (s für *shift*) durch TLS analog zur Formel für die Linienbreite angesetzt werden:

$$\delta_s(T) = a_s T^\alpha \quad (3.43)$$

Der Faktor a_s sei ein Maß für die Verschiebungsstärke und soll nahe bei 0 liegen, und α sei der Exponent nahe bei 1. Auch hier treten, wie aus dem Abschnitt über spektrale Diffusion schon bekannt, häufig Frequenzsprünge auf, die mit einer exakten analytischen Beschreibung nicht wiedergegeben werden können. Einzelne große Sprünge während der temperaturabhängigen Messung der Linie können häufig identifiziert und korrigiert werden und kleine Beiträge werden durch die angesetzte Temperaturabhängigkeit einbezogen. Manchmal erlauben aber auch mehrere Sprünge keine sinnvolle Auswertung der Frequenztrajektorie.

Kopplung an pseudolokale Phononen

Die Wechselwirkung mit Phononen moduliert die Frequenz des elektronischen Übergangs und führt zu einer Verschiebung und Verbreiterung der Absorptionslinie, die sich durch Anwendung der Störungstheorie beschreiben lassen. In einer im Rahmen der harmonischen Näherung, also in der Entwicklung bis zum quadratischen Glied in den Schwingungskoodinaten exakten Theorie, haben Hsu und Skinner analytische Ausdrücke für Verschiebung und Verbreiterung herleiten können [76, 119, 120]. Die Verschiebung beruht auf der quadratischen Elektron-Phonon-Kopplung, die zu einem veränderten Schwingungspotential für das angeregte Molekül und damit für den Fall, dass das Molekül angeregt ist, zu einer anderen Phononenfrequenz ω_1 führt (im Vergleich zu ω_0 , der Phononenfrequenz für das Molekül im Grundzustand). Das System Chromophor + Phonon hat damit eine um $(\omega_1 - \omega_0)$ veränderte Übergangsfrequenz. Die Wechselwirkung eines Zwei-Niveau-Systems mit einem Phonon ist schematisch in Abb. 3.10 dargestellt.

Die in der Theorie erhaltenen Ausdrücke sind komplexe, uneigentliche Integrale, die von der Besetzungszahl (Gl. 3.41) und der Zustandsdichte der pseudolokalen

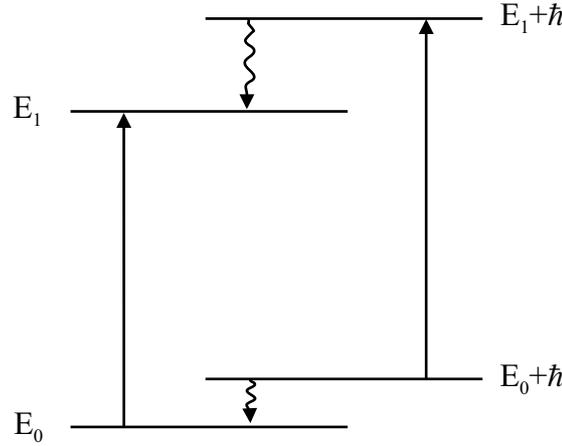


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Kopplung eines Phonons an einen elektronischen Übergang. Durch die unterschiedlichen Energien $\hbar\omega_0$ bzw. $\hbar\omega_1$ und Lebenszeiten τ_0 bzw. τ_1 des Phonons für das Molekül im Grund- bzw. angeregten Zustand ergibt sich für das System Molekül + Phonon eine geänderte Absorptionsfrequenz und Linienbreite. Die Phononenenergie ist im Vergleich zur molekularen Übergangsenergie stark vergrößert dargestellt.

Phononen abhängen. Im Grenzfall tiefer Temperaturen ($k_B T \ll \hbar\omega_0$) lässt sich das Ergebnis für die Linienbreite durch eine biexponentielle Abhängigkeit nähern:

$$\Delta\nu_{hb}(T) = \Delta\nu_{hb_0} + \frac{1}{\pi} \frac{(\delta\omega \tau^*)^2}{1 + (\delta\omega \tau^*)^2} \left(\frac{1}{2\tau_0} e^{-\frac{\hbar\omega_0}{k_B T}} + \frac{1}{2\tau_1} e^{-\frac{\hbar\omega_1}{k_B T}} \right) \quad (3.44)$$

mit $\delta\omega = (\omega_1 - \omega_0)$ und $\frac{2}{\tau^*} = \frac{1}{\tau_0} + \frac{1}{\tau_1}$. Betrachtet man weiter den Grenzfall schwacher Kopplung, der für die in der Tieftemperatur-Einzelmolekülspektroskopie verwendeten Systeme angenommen werden kann, so gilt $\omega_1 \approx \omega_0$ und $\tau_1 \approx \tau_0$ und damit

$$\Delta\nu_{hb}(T) = \Delta\nu_{hb_0} + \underbrace{\frac{1}{\pi} \frac{(\delta\omega^2 \tau_0)}{1 + (\delta\omega \tau_0)^2}}_{:=b_w} e^{-\frac{\hbar\omega_0}{k_B T}}. \quad (3.45)$$

Die Verbreiterung genügt damit für tiefe Temperaturen und schwache Kopplung einem Arrhenius-Gesetz, das schon in der Austauschtheorie von Harris [121, 122], im störungstheoretischen Ansatz von Small [123] und Jones und Zewail [124], sowie in der Redfield-Relaxationstheorie von de Bree und Wiersma [125] gefunden wurde. Der präexponentielle Faktor kann im Limit schnellen Austausches ($|\delta\omega|\tau_0 \ll 1$) zu $\delta\omega^2 \tau_0/\pi$ und im Falle des langsamen Austausches ($|\delta\omega|\tau_0 \gg 1$) zu $1/(\pi \tau_0)$ genähert werden.

Für die Verschiebung δ_s lässt sich nur bei gleichzeitiger Näherung für kleine Temperaturen ($k_B T \ll \hbar\omega_0$) und schwache Kopplung ein einfacher Ausdruck angeben:

$$\delta_s(T) = \underbrace{\frac{\delta\omega}{2\pi}}_{:=b_s} e^{-\frac{\hbar\omega_0}{k_B T}}. \quad (3.46)$$

Das Vorzeichen der Verschiebung, + hin zu größeren Frequenzen (blau) oder - zu kleineren Frequenzen (rot), hängt davon ab, ob das Phonon im angeregten Zustand eine höhere oder niedrigere Energie hat als im Grundzustand.

Signifikante Abweichungen durch die Tieftemperaturnäherungen treten erst bei Temperaturen $T > 0,3 (\hbar\omega_0/k_B)$ auf. Durch Anpassung der theoretischen Graphen an die Messpunkte kann die Energie des pseudolokalen Phonons $\hbar\omega_0$ angegeben werden, die im Exponenten in den Gleichungen für die Linienverbreiterung $\Delta\nu_{hb}(T)$ und die -verschiebung $\delta_s(T)$ gleichermaßen auftritt. Durch genauere Auswertung der Vorfaktoren b_w und b_s können weiter der Energieunterschied $\delta\omega$ des Phonons bei Ankopplung an den Grund- bzw. angeregten Zustand und die mittlere Lebenszeit τ_0 des Phonons bestimmt werden.

Beiträge durch Matrixexpansion

Bei der Beschreibung der Linienverschiebung muss auch der statische Effekt der Volumenexpansion einbezogen werden. Denkt man sich die Volumenausdehnung bis ins Unendliche fortgesetzt, entspricht dieser Effekt gerade dem *Solvent Shift*, der die Verschiebung der Absorptionsfrequenz eines Farbstoffmoleküls im Festkörper relativ zu der im Vakuum angibt. Setzt man die Übergangsfrequenz ν als Funktion der Temperatur T und des Volumens V an, so gilt für ihre Temperaturabhängigkeit [126]:

$$\begin{aligned} \frac{d\nu}{dT} &= \left(\frac{\partial\nu}{\partial T}\right)_V + \left(\frac{\partial\nu}{\partial V}\right)_T \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_{(p)} \\ &= \left(\frac{\partial\nu}{\partial T}\right)_V + \left[\left(\frac{\partial\nu}{\partial p}\right)\left(\frac{\partial p}{\partial V}\right)\right]_T \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_{(p)} \end{aligned} \quad (3.47)$$

Der erste Summand beinhaltet die dynamischen Beiträge durch die Wechselwirkung mit TLS und Phononen. Der zweite Summand kann durch Einführung der isothermen Kompressibilität $\kappa = -\frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial p}\right)_T$ und des isobaren thermischen Längenausdehnungskoeffizienten $\alpha_{lin} = \frac{1}{L}\left(\frac{\partial L}{\partial T}\right)_p = \frac{1}{3}\frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_p$ vereinfacht werden zu $-3\alpha_{lin}/\kappa\left(\frac{\partial\nu}{\partial p}\right)_T$.

Ist κ , α_{lin} , sowie die isotherme Druckabhängigkeit in diesem Temperaturbereich bekannt, so kann der Beitrag der Matrixexpansion zur Linienverschiebung relativ zur Übergangsfrequenz ν_0 (für $T \rightarrow 0$) mit

$$\delta_s = - \int_0^T \frac{3\alpha_{lin}}{\kappa} \left(\frac{\partial \nu}{\partial p} \right)_T dT' \quad (3.48)$$

angegeben werden. Die isotherme Druckabhängigkeit $(\frac{\partial \nu}{\partial p})_T$, die für zwei Farbstoff-Matrix-Systeme bereits auf Einzelmolekülbasis gemessen worden ist [21, 127], und die isotherme Kompressibilität κ , sind näherungsweise unabhängig von der Temperatur und können vor das Integral gezogen werden.

Linienbreite und Linienposition als Funktion der Temperatur

Setzt man nun alle Beiträge zusammen, ergeben sich folgende Gleichungen für die Temperaturabhängigkeit von Linienbreite $\Delta\nu_{hb}(T)$ und Linienverschiebung $\delta_s(T)$:

$$\begin{aligned} \Delta\nu_{hb}(T) &= \Delta\nu_{hb0} + a_w T^\alpha + b_w e^{-\frac{T_0}{T}} \\ \delta_s(T) &= \delta_0 + a_s T^\alpha + b_s e^{-\frac{T_0}{T}} - \frac{3}{\kappa} \left(\frac{\partial \nu}{\partial p} \right)_T \int_0^T \alpha_{lin} dT' \end{aligned} \quad (3.49)$$

Die Einführung der Offset-Verschiebung δ_0 ist nötig, da die Experimente nicht bei $T = 0$ beginnen. Die Energie der pseudolokalen Mode wurde in Form der zugehörigen Temperatur $T_0 = \hbar\omega_0/k_B$ eingesetzt. Sie kann über die Beziehung $\bar{\nu}/[\text{cm}^{-1}] = 0,7 T/[\text{K}]$ leicht in den entsprechenden Wert in Wellenzahlen $\bar{\nu}(= \omega/(2\pi c))$ umgerechnet werden.

Kapitel 4

Experimenteller Aufbau

Die spektral hochauflösenden Tieftemperaturmessungen wurden an der von J. Tittel [128] und S. Kummer [129] aufgebauten Apparatur durchgeführt, die zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stand.

In diesem Kapitel wird zunächst ein kurzer Überblick über das Lasersystem gegeben. Die Frequenzstabilität des Lasersystems ist Voraussetzung für eine fehlerfreie Durchführung vieler Experimente, wie beispielsweise der Untersuchung der temperaturabhängigen Verschiebung der Absorptionslinie oder Messungen mit resonanter Anregung der Moleküle über einen längeren Zeitbereich. Der verwendete Farbstofflaser zeigte eine inakzeptable Drift und wurde deshalb um eine externe Frequenzstabilisierung erweitert, deren Aufbau und Funktionsweise innerhalb des ersten Teils dieses Kapitels behandelt wird. Im Weiteren werden wichtige optische Elemente im Aufbau beschrieben und anschließend die gesamte, vorhandene Apparatur zur spektral selektierenden Einzelmolekülspektroskopie („Faser- und Linsenaufbau“) vorgestellt.

Viele Chromophore zeigen selbst bei Temperaturen von 1,4 K noch deutlich verbreiterte Linien und konnten deshalb mit der vorhandenen Apparatur nicht isoliert werden. Die Aufhebung dieser Beschränkungen der frequenzselektiven Isolationstechnik auf eine sehr kleine Klasse an Farbstoff-Matrix-Systemen forderte deshalb die Planung und Durchführung wesentlicher Veränderungen am experimentellen Aufbau. Um die Vorteile der tiefen Temperaturen weiter nutzen zu können und gleichzeitig die spektroskopierbaren Systeme und experimentellen Möglichkeiten deutlich zu erweitern, musste die Technik räumlicher Isolation einzelner Moleküle für Proben im Kryostaten verwirklicht werden. Dieses Ziel räumlicher Auflösung konnte durch den Eigenbau eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops um den vorhandenen Kryostaten erfolgreich realisiert werden und stellt einen wesentlichen Teil dieser Disser-

tation dar. Im vierten Teil dieses Kapitels wird deshalb besonders ausführlich auf die gewählten Komponenten und die Funktionsweise eingegangen.

4.1 Das Lasersystem

4.1.1 Argon- und Farbstofflaser

Als Anregungslichtquellen stehen ein Argonionenlaser (*Coherent Sabre 15/3 R*) und ein Farbstofflaser (*Coherent 699-21*) zur Verfügung. Beide sind Dauerstrichlaser (cw-Laser, *continuous wave*). Der Ar^+ -Laser wurde meist als Pumplaser für den Farbstofflaser verwendet. Dazu wurde er für die gelb/roten Farbstoffe Rhodamin 6G (Emission: 560-620 nm) und DCM* (Emission: 615-680 nm) *single line* mit 514 nm (Pumpleistung 6 W), und für den blauen Farbstoff Stilben 3 (Emission: 420-465 nm) *multiline* im UV (Pumpleistung 3 W) betrieben. Für einige Anwendungen wurden direkte Linien des Ar^+ -Laser mit den Wellenlängen 488 bzw. 476 nm verwendet.

Zur spektralen Selektion einzelner Moleküle benötigt man eine schmalbandige Laserlichtquelle, die in der Frequenz verstimmbar ist. Diese Anforderungen erfüllt der Farbstofflaser, dessen Aufbau in Abb. 4.1 dargestellt ist. Er besteht aus einem

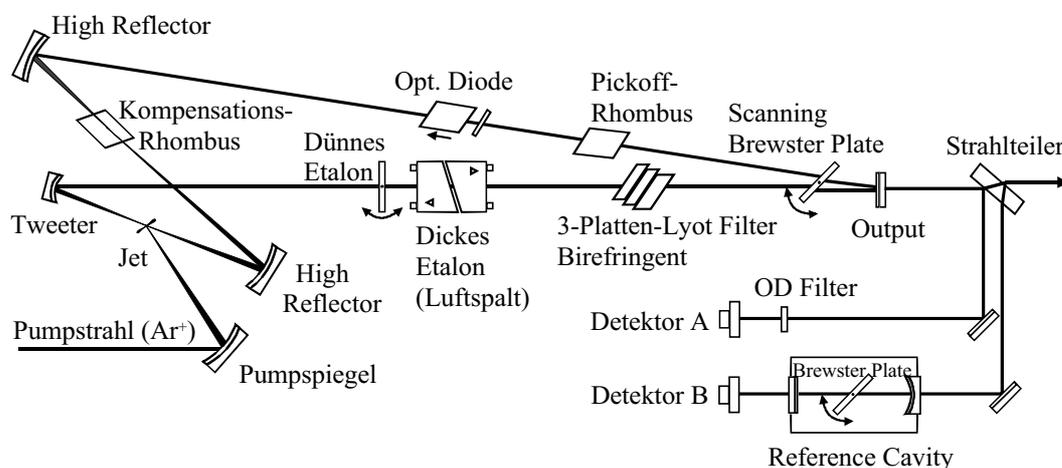


Abbildung 4.1: Der Ringresonator des Farbstofflasers 699-21 mit allen zugehörigen optischen Elementen (Zeichnung von H.-W. Augustin).

Ringresonator, durch dessen Strahlengang eine Farbstofflösung gespritzt wird. Die Farbstoffmoleküle werden durch den Pumplaser angeregt und können in die Resonatormoden emittieren. Durch ein doppelbrechendes Filter (3-Platten-Lyot Filter oder *Birefringent*), ein dünnes Etalon und ein dickes Etalon im Strahlengang wird

Tabelle 4.1: Umrechnung des Frequenzbereichs $\Delta\nu$ von 30 GHz in Wellenlängendifferenzen $\Delta\lambda$ und Wellenzahldifferenzen $\Delta\bar{\nu}$

	$\Delta\nu$	$\Delta\lambda$	$\Delta\bar{\nu}$
bei $\lambda = 440$ nm (blau)	30 GHz	$\frac{1}{50}$ nm	1 cm^{-1}
bei $\lambda = 580$ nm (rot)	30 GHz	$\frac{1}{30}$ nm	1 cm^{-1}

aus der Vielzahl der Resonatormoden eine Einzige selektiert, die die Laserschwelle überwindet und verstärkt wird. Die Ausbreitung des Laserlichts im Ringresonator wird durch eine optische Diode auf eine Richtung beschränkt. Die optische Diode besteht aus zwei Elementen: einer optisch aktiven Platte, die die Polarisations Ebene des Lichts immer in dieselbe Richtung relativ zur Ausbreitungsrichtung dreht, und einem Faraday Rotator, dessen Rotationsrichtung von der relativen Orientierung des Magnetfelds abhängt. In der einen Richtung heben sich die beiden Effekte gegenseitig auf (Durchlassrichtung), in der anderen führen sie zu einer effektiven Drehung der Polarisation um 90° . Für diese Polarisationsrichtung treten nun trotz des Lichtdurchgangs unter dem Brewsterwinkel Reflexionsverluste auf, die das Anschwingen dieser Moden verhindern.

Zur Vermeidung einer Frequenzdrift infolge von thermischer Ausdehnung des Resonators oder Dichteschwankungen im Lasermedium und zur Vermeidung von Frequenzsprüngen, die innerhalb der Transmissionskurve des dicken Etalons auftreten können, wird die Resonatorlänge aktiv stabilisiert. Die Informationen zur Regelung werden durch das Transmissionssignal eines geheizten Referenzresonators (*Reference Cavity*), in dem sich eine drehbar gelagerte, planparallele Platte (*Brewster Plate*) befindet, geliefert. Auf das Prinzip, das analog zur externen Stabilisierung funktioniert, wird im übernächsten Abschnitt eingegangen. Die ausgleichenden Elemente im Ringresonator sind ein piezogelagerter Resonatorspiegel (*Tweeter*, Regelung von 100 Hz bis 10 kHz) und eine weitere drehbar gelagerte, planparallele Platte (*Scanning Brewster Plate*, Regelung bis 10Hz) . Die Linienbreite im aktiv stabilisierten Modus ist < 1 MHz.

Zur kontrollierten Verstimmung des Lasers in der Frequenz wird die Brewster Platte im Referenzresonator gleichmäßig um einen geringen Winkel verkippt, wodurch sich die optische Weglänge im Resonator ändert. Durch einen elektronischen Regelkreis wird auch die Scanning Brewster Plate im Ringresonator verkippt und damit die Frequenz des Lasers durchgestimmt. Dies ist über einen Bereich von maximal 30 GHz möglich. Damit keine Modensprünge auftreten, müssen dünnes und vor allem dickes Etalon durch die Elektronik geeignet mitgeführt werden. Zum einwandfreien Betrieb ist es notwendig, dass sowohl die Optik, als auch die Elektronik des

Regelkreises, optimal justiert sind. Trotz optimaler Justierung treten beim Scan Intensitätsschwankungen auf, die durch den geänderten Lichtweg in Resonator und die Verkippung der Brewster-Platte aus der reflexionsfreien Stellung (Brewster-Winkel) entstehen. Eine nachträgliche Intensitätsstabilisierung ist deshalb nötig. Über den BNC-Eingang *Ext. Scan* an der *Control Box* kann der Laser auch extern gesteuert verstimmt werden. Mit einer Spannung zwischen -5 und +5 V kann jede Frequenz des gewählten Scanbereichs angefahren werden.

Bevor auf die externe Stabilisierung eingegangen wird, sollen die zu deren Verständnis wichtigen Grundlagen von optischen Resonatoren dargestellt werden.

4.1.2 Optische Resonatoren

Resonatoren sind wichtige Elemente in der Optik und Grundlage jedes Lasers. Sie sind in der Literatur viel beschrieben, besonders ihre Stabilitätseigenschaften und die Feldverteilungen [130, 131, 132]. Hier soll nur auf das Transmissionsverhalten eines Resonators eingegangen werden, weil es von großer Bedeutung für die Kontrolle und Stabilisierung des Lasersystems ist.

Die neben dem Ringresonator des Lasers verwendeten Resonatoren sind konfokale Fabry-Perot-Resonatoren. Sie bestehen aus zwei sphärischen Spiegeln, die im Abstand ihrer Brennweiten angeordnet sind (Brennweite $f = R_k/2$ bei einem Krümmungsradius R_k). Die Reflexionskoeffizienten bezüglich der Intensität R (bezüglich der elektrischen Feldamplitude wird r verwendet mit $R = r^2$) liegen bei 99 %. Koppelt man nun Licht in den Resonator ein, kommt es zur Mehrstrahlinterferenz zwischen dem im Resonator reflektierten Licht verschieden häufiger Umläufe. Die Interferenz ist konstruktiv, wenn die Weglänge eines Umlaufzyklus ein Vielfaches der Wellenlänge des Lichts ist (bei Resonatoren mit planparallelen Spiegeln ist diese Weglänge der doppelte, bei konfokalen der vierfache Spiegelabstand; bei Ringresonatoren ist es die einfache Ringstrecke). Aus dieser Bedingung lassen sich alle Frequenzen ν_m berechnen, die bei gegebener, effektiver Resonatorlänge l zu konstruktiver Interferenz führen (für l ist bei konfokalen Resonatoren der doppelte Spiegelabstand zu wählen; bei um einen Winkel θ_t zwischen Normalenvektor und optischer Achse schräg stehenden Etalons mit Brechungsindex n und Dicke d ist die effektive optische Weglänge $n d / \cos \theta_t$ zu wählen). Diese Resonanzfrequenzen ν_m treten in gleichmäßigem Abstand auf. Ihr Abstand ($\nu_{m+1} - \nu_m$) wird freier Spektralbereich (*FSR*) genannt und ist

$$FSR = \frac{c}{2l} \tag{4.1}$$

mit der Vakuumlichtgeschwindigkeit c . Die Erfüllung der Interferenzbedingung führt auch zu maximalem Transmissionssignal. Passen Lichtfrequenz ν und Resonatorlänge l nicht, kommt es zu destruktiver Interferenz. Das Maß der Auslöschung hängt nun einerseits davon ab, wie weit die tatsächliche Frequenz ν gegenüber einer Resonanzfrequenz ν_m verstimmt ist, und andererseits davon, wie oft die Strahlen durchschnittlich reflektiert werden. Dies wiederum hängt ausschließlich von den Reflexionskoeffizienten R der Spiegel ab. Ist R groß (nahe bei 1), so führt schon eine geringe Abweichung von einer der Resonanzfrequenzen ν_m zu einer fast vollständigen Auslöschung im Resonator, womit auch keine Transmission auftritt. Ist R klein ($R < 0,2$), so kommt es nur zu einer geringen Abschwächung der Intensität für diesen Fall. Die quantitative Behandlung der Mehrstrahlinterferenz [95] führt zur Airy-Funktion, die das Transmissionssignal I_t relativ zur eingekoppelten Intensität I_0 angibt (die Airy-Funktion steht in keinem Zusammenhang mit dem Airy-Muster):

$$\frac{I_t}{I_0} = \frac{1}{1 + F \sin^2\left(\frac{2\pi}{c} \nu l\right)} \quad (4.2)$$

Dabei wurde der Finessefaktor F eingeführt entsprechend

$$F = \frac{4R}{(1 - R)^2}. \quad (4.3)$$

In Abb. 4.2 sind die Graphen der Airy-Funktion für zwei verschiedene Reflexionskoeffizienten R bzw. Finessefaktoren F dargestellt. Der gestrichelte Graph entspricht in etwa dem Transmissionsverhalten eines der Etalons im Laser, der durchgezogene dem eines hochreflektierenden Fabry-Perot-Resonators. Die Intensität im Resonator verhält sich entsprechend und ist nur um den Faktor $\ddot{U} = \frac{1}{1-R}$ überhöht (\ddot{U} : Überhöhung). Für hochreflektierende Resonatoren ist es üblich, die Finesse \mathcal{F} anzugeben. Sie ist definiert als Verhältnis zwischen freiem Spektralbereich FSR und Halbwertsbreite $\Delta\nu_{hb}$ der Transmissionspeaks. Mit $\Delta\nu_{hb} = c/(\pi l \sqrt{F})$ (für $F \gg 1$ aus Gl. 4.2) erhält man

$$\mathcal{F} = \frac{FSR}{\Delta\nu_{hb}} = \frac{\pi \sqrt{F}}{2} = \frac{\pi \sqrt{R}}{1 - R}. \quad (4.4)$$

Zur Kontrolle des stabilen Farbstofflaserbetriebs und zur Eichung der Anregungsspektren wird ein hochreflektierender Resonator verwendet. Es ist ein konfokaler Fabry-Perot-Resonator (*Coherent Spectrum Analyser*, FSR 1,5 GHz bzw. 7,5 GHz;

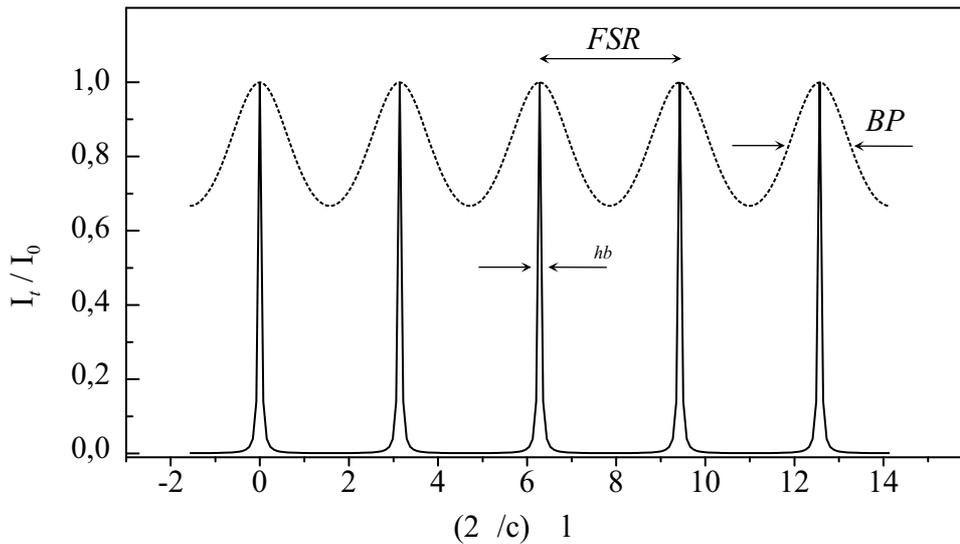


Abbildung 4.2: Airy-Funktionen, die das Transmissionsverhalten eines Etalons (gestrichelte Linie; $R=0,10$ bzw. $F=0,5$) bzw. das eines hochreflektierenden Resonators (durchgezogene Linie; $R=0,94$ bzw. $F=1000$) darstellt.

$\mathcal{F} \approx 200$), in den ein Teil des Laserlichts eingekoppelt wird. Während des gesamten Laserbetriebs wird der Resonator mittels eines piezogehalterten Spiegels in der Länge durchgestimmt. Das Transmissionssignal wird mit einer Photodiode detektiert und auf einem Oszilloskop in Abhängigkeit der Resonatorlänge dargestellt. Es zeigt die Airy-Funktion (ähnlich Abb 4.2, durchgezogene Linie), die im Falle eines Frequenzscans kontinuierlich wandert. Treten Modensprünge auf, können sie durch Sprünge der Intensitätsmaxima erkannt werden. Zur Eichung des Laserscans wird die Länge des Resonators konstant gehalten und der Laser verstimmt. Zwischen jedem auftretendem Maximum hat sich die Laserfrequenz genau um den Wert des FSR verändert.

Zum Ende dieses Abschnitts soll noch einmal kurz auf die Modenselektion im Farbstofflaser zurückgekommen werden. Im Ringresonator ohne weitere frequenzselektive Elemente treten Moden im Abstand (FSR) von 0,18 GHz auf. Zur Grobselektion dient das doppelbrechende Filter (*Birefringent*, freier Spektralbereich (FSR): 83 THz, Bandpass (BP; Frequenzbreite, bei der das Signal bis zur Mitte zwischen Maximum und Minimum abfällt): 1,7 THz). Es selektiert genau einen Bereich innerhalb der Verstärkungskurve des Farbstoffs und funktioniert anders als die Modenselektion von Etalons. Hier führt Doppelbrechung zu einer wellenlängenabhängigen Polarisationsänderung, so dass viele Wellenlängen durch Verluste an den Brewster-Flächen unterdrückt werden. Die weitere Modenselektion erfolgt mit dem dünnen Etalon (FSR : 225 GHz, BP: 130 GHz) und dem dicken Etalon (FSR : 10 GHz, BP: 5 GHz).

Insgesamt wird nur eine Resonatormode verstärkt, deren Frequenz von allen drei optischen Elementen effizient transmittiert wird. In Abb. 4.3 ist dies schematisch dargestellt.

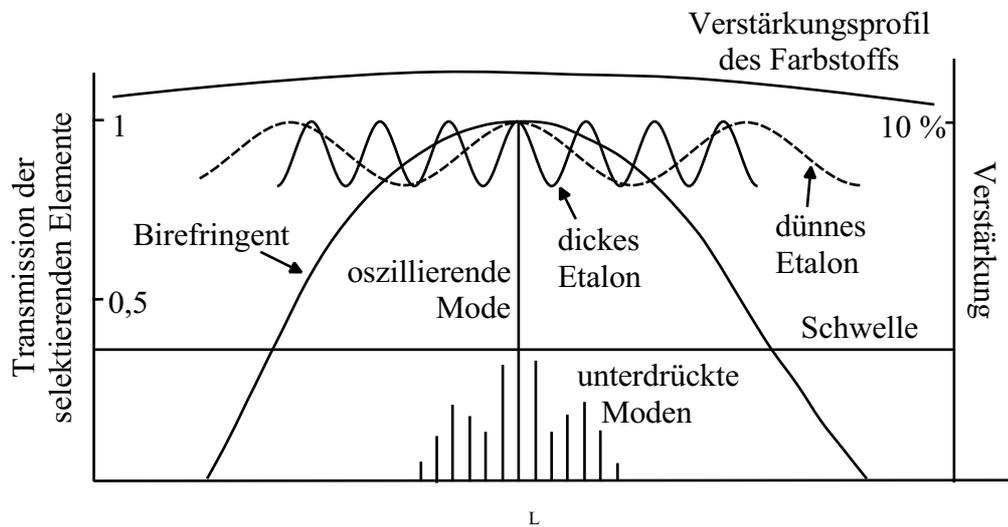


Abbildung 4.3: Veranschaulichung der Selektion der Resonatormoden durch das doppelbrechende Filter und das dünne und dicke Etalon [133].

Für Farbstoffe bei Raumtemperatur, die breitbandig absorbieren, ist die erreichte Linienbreite von < 1 MHz unnötig schmal. In diesem Fall ist auch eine Verstimmung des Lasers um 30 GHz uninteressant und ohne Effekt, da typische Absorptionsbanden 30 nm breit sind, was etwa dem 1000 fachen entspricht. Für derartige Experimente wurden die beiden Etalons, die gemeinsam in einer *Intracavity Assembly* (ICA) eingebaut sind, aus dem Ringresonator entnommen. Außerdem wurde die *Scanning Brewster Plate* ausgebaut, die auch zur Linienverschmälerung beiträgt. Unter diesen Bedingungen schwingen mehrere Resonatormoden über einen Bereich von ca. 2 GHz an, die sich am 7,5 GHz *Spectrum Analyser* beobachten lassen können. Zum Scannen des Lasers wird das *Birefringent* an der Mikrometerschraube motorgetrieben verdreht und damit die Frequenz durchgestimmt. Während des Durchstimmens kann keine Mode stark anschwingen, weil sich die Resonanzbedingungen ständig ändern. Im Transmissionssignal des 7,5 GHz *Spectrum Analyser* sieht man über den gesamten Bereich kleine Peaks. Da aber das im Experiment zur Wellenlängenbestimmung verwendete *Wavemeter* (*Burleigh WA 10*) im Grobmodus (0,03 nm Genauigkeit) noch anzeigt, muss die Frequenzbreite während des Durchstimmens unter 50 GHz liegen. Würde man die ICA nicht entfernen und das *Birefringent* genauso verdrehen, würden Frequenzsprünge um den freien Spektralbereich des nächstselektierenden Elements, also des dünnen Etalons mit $FSR = 225$

GHz, auftreten.

4.1.3 Externe Stabilisierung

Die Lage der Frequenz des Farbstofflasers relativ zur molekularen Übergangsfrequenz hat für einen Großteil der Experimente einen entscheidenden Einfluss auf die Genauigkeit der Messergebnisse und ihren Fehlerbereich. Zu diesen Experimenten zählen sowohl frequenzselektive Anregungen einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen, als auch solche, bei denen der Laser wiederholt über einen definierten Frequenzbereich durchgestimmt werden muss. Eine Drift in der Größenordnung weniger MHz/h kann als akzeptabler Richtwert angegeben werden, verglichen mit den Halbwertsbreiten der Absorptionslinien von ca. 40 MHz und Messzeiten an einem Molekül von oft mehreren Stunden. Die relative Frequenzänderung $\Delta\nu/\nu$ muss damit für die optischen Frequenzen von ca. $5 \cdot 10^{14}$ Hz kleiner als 10^{-8} sein. Die Resonatorlänge l muss wegen $\Delta\nu/\nu = -\Delta l/l$ (gültig, falls keine Modensprünge auftreten: $\Delta m = 0$) für typische Längen $l = 0,5$ m auf 5 nm konstant bleiben. Selbst für Invar mit einem Längenausdehnungskoeffizienten α ($\alpha = (\Delta l/l)/\Delta T$) von nur $1,5 \cdot 10^{-6}/\text{K}$ erfordert dies eine Temperaturkonstanz von $\pm 0,01$ K [134]. Gemäß Herstellerangaben kann die Drift des Farbstofflasers bis zu 100 MHz/h betragen. Zur Verringerung dieser Drift wurde der Farbstofflaser auf einen frequenzstabilisierten HeNe-Laser (*Melles Griot* 05STP901, Drift < 3 MHz/8h) stabilisiert und die Scan-Funktion durch einen akustooptischen Modulator (AOM, *A.A. Opto-Elektronique* AA.MP10/350) erreicht.

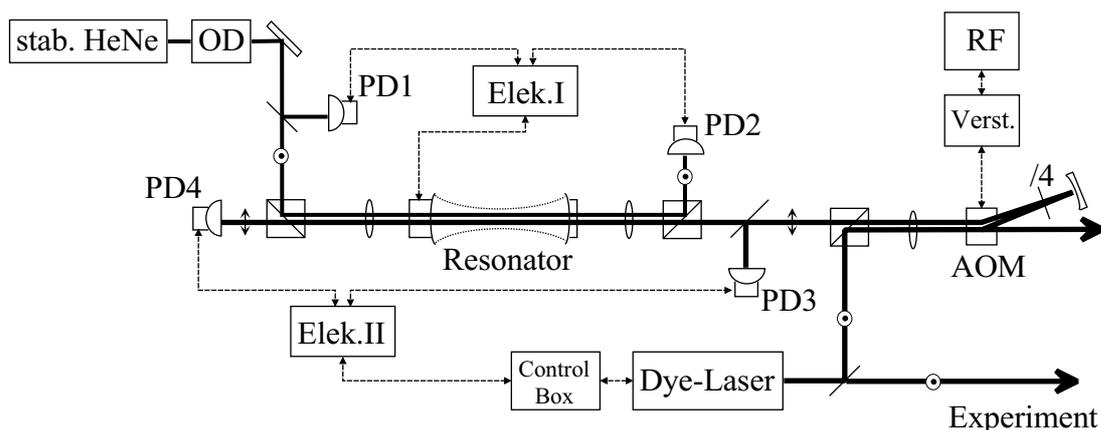


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der externen Stabilisierung (Abkürzungen: OD Optische Diode, PD Photodiode, ⊙ ↓ Polarisationsrichtungen, RF Radiofrequenzgenerator).

Der Aufbau ist in Abb. 4.4 dargestellt. Kernstück der Stabilisierung ist ein konfokaler Fabry-Perot-Resonator (*Coherent Spectrum Analyzer* Modell 216, FSR: 300

MHz, \mathcal{F} : 218). Über das Transmissionssignal wird zunächst dieser Resonator auf die Übergangslinie des kommerziellen, frequenzstabilisierten HeNe-Lasers stabilisiert, d.h. auf konstanter Länge gehalten. Im zweiten Schritt wird der Farbstofflaserstrahl mit anderer Polarisationsrichtung ebenfalls in den Resonator eingekoppelt und auf den Resonator stabilisiert.

Dabei benützt die Regelelektronik [135] das Transmissionssignal des Resonators (gemessen mit Photodiode PD2), das in Abhängigkeit von seiner Länge periodische Maxima besitzt, sowie ein Referenzsignal (gemessen mit Photodiode PD1), mit dem der Lock-Punkt unabhängig von der Laserintensität wird. Das Blockschaltbild der Elektronik ist in Abb. 4.5 dargestellt. Der Regelnullpunkt ist auf halber Höhe des

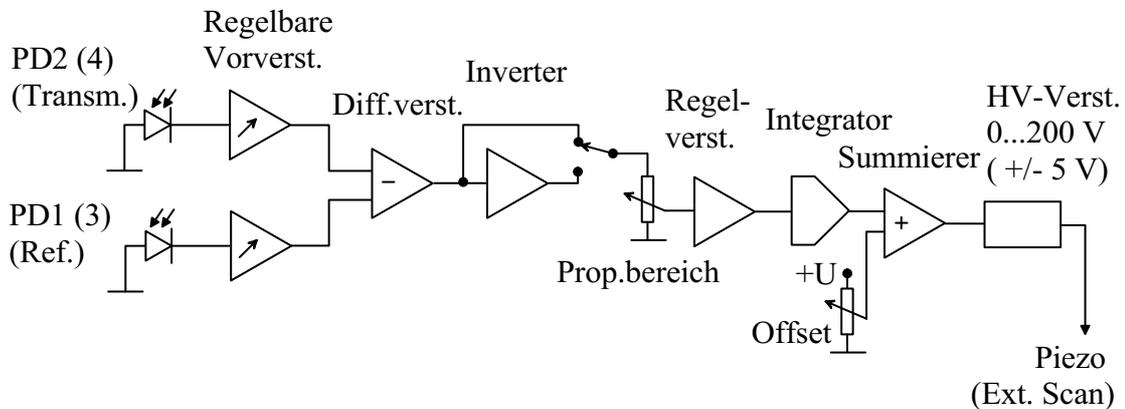


Abbildung 4.5: Blockschaltbild des elektronischen Regelkreises für Elektronik I (die Angaben in Klammern sind für Elektronik II).

Transmissionsspeaks (vgl. Abb. 4.2) und wird durch Differenz von Transmissions- und Referenzsignal (nach geeigneter Vorverstärkung) erreicht. Verändert sich die Länge des Resonators, so ergibt das Differenzsignal einen von Null verschiedenen Wert, der für unterschiedliche Driftrichtungen auch andere Vorzeichen hat. Nach geeigneter Verstärkung, Integration und Summation erhält man eine Korrekturspannung, die zur Längenregelung an einen Piezo angelegt wird. Einer der Resonatorspiegel ist auf diesen Piezo aufgeklebt, so dass die Länge des Resonators in die Ausgangsstellung nachgeregelt werden kann. Eine zusätzlich einstellbare Offset-Spannung dient zur anfänglichen Einstellung der Resonatorlänge.

Mit diesem ersten Teil des Aufbaus lässt sich die Frequenzdrift des Farbstofflasers kontrollieren. Dazu wird dessen Strahl mit senkrechter Polarisationsrichtung bezüglich der des HeNe-Lasers durch den Resonator gekoppelt, die beiden Strahlen außerhalb des Resonators mit Polarisationsstrahlteilerwürfeln getrennt und bei jedem Scan das Transmissionssignal des Farbstofflasers aufgezeichnet. Eine Drift der

Maxima entspricht gerade der Drift des Farbstofflasers. Diese Methode wurde zur Driftkorrektur bei den temperaturabhängigen Messungen der Linienpositionen einzelner Moleküle verwendet. Die Messungen ergaben eine durchschnittliche Drift des Farbstofflasers von 20 MHz/h.

Die aktive Stabilisierung des Farbstofflasers auf den Resonator wird nun in einem zweiten Schritt realisiert. Um den Laser weiterhin scannen zu können, passiert der Strahl einen akustooptischen Modulator (AOM), der einen Teil des Lichts um die angelegte Radiofrequenz (erzeugt mit einem Frequenzgenerator, *Rhode&Schwarz* SMT02, und einem Verstärker *A.A. Opto-Electronique* RF Amplifier 10 - 500 MHz) verstimmt und räumlich ablenkt (siehe Abb. 4.4). Der AOM besteht aus einem PbMoO_4 -Kristall, in dem mit der Hochfrequenz eine akustische Welle erzeugt wird. Quantenmechanisch lässt sich der auftretende Effekt als Absorption eines Phonons durch ein Photon verstehen. Dabei gelten Energie und Impulserhaltung [136]:

$$\nu' = \nu + \nu_a \quad \text{und} \quad \vec{k}' = \vec{k} + \vec{k}_a \quad (4.5)$$

Die Verschiebung der Lichtfrequenz ν ergibt sich (für die erste Beugungsordnung) also direkt aus der angelegten Radiofrequenz ν_a . Da die Ausbreitungsrichtung der akustischen Welle näherungsweise senkrecht zu der des Lichts liegt, lässt sich der Ablenkwinkel α direkt aus dem Impulsverhältnis bestimmen:

$$\alpha \approx \sin \alpha \approx \frac{k_a}{k} = \lambda \frac{\nu_a}{v_a}. \quad (4.6)$$

Die Schallgeschwindigkeit v_a der akustischen Welle ist im vorhandenen Kristall 3636 m/s, so dass typische Beugungswinkel bei 3° liegen. Der AOM ist auf Wellenlängen um 560 nm und Frequenzshifts von $\nu_a = 300 \pm 100$ MHz optimiert. Für die Zentralfrequenz hat er eine Beugungseffizienz von 50 %.

Nach Durchlaufen eines $\lambda/4$ Plättchens wird das Licht mit einem sphärischen Spiegel zu einer zweiten Frequenzverschiebung in den AOM fokussiert (zur Herstellung eines sphärischen Spiegels wurde eine Plankonkav-Linse bedampft; die Brennweite des Spiegels $f_s = R_s/2$ ergibt sich aus dem Krümmungsradius der Oberfläche R_s und dieser aus der Brennweite f_l der Linse mit Hilfe der Linsenschleifergleichung: $R_s = (n-1)f_l$). Das zweimalige Durchlaufen der $\lambda/4$ Platte hat den Effekt einer $\lambda/2$ Platte und dreht die lineare Polarisierung um 90° (bei richtigem Einbau des Plättchens mit der Hauptachse im 45° -Winkel zur ursprünglichen Polarisierung). Mit der gedrehten Polarisationsrichtung kann der Farbstofflaserstrahl vom HeNe-Strahl unterschieden werden, passiert einen Polarisationsstrahlteiler und wird durch den Resonator gekoppelt. Mit entsprechender Detektion eines Referenz- (PD3) und Transmissionsstrahls (PD4) wie im ersten Teil, und einer Elektronik (II), die analog zu dem

eben beschriebenen Prinzip funktioniert, wird der Farbstofflaser auf eine gewünschte Frequenz stabilisiert. Zur Nachregelung wird hier jedoch keine Hochspannung an einen Piezo angelegt, sondern das Korrektursignal an den *Ext. Scan*-Eingang (± 5 V) des gelockten Farbstofflasers angelegt. Die Lichtfrequenz im Resonator bleibt damit immer konstant. Wird durch den AOM die Lichtfrequenz verstimmt, wird der Farbstofflaser durch die Elektronik entsprechend gegenverstimmt. Lineare Frequenzscans, die sich am Frequenzgenerator mit hoher Präzision erzeugen lassen, führen damit zum reproduzierbaren und driftfreien Scannen des Lasers.

4.2 Optische Elemente im Anregungsstrahlengang

Vom Farbstofflaserstrahl werden nach Verlassen des Ringresonators 30 % an einem Strahlteiler (vgl. Abb. 4.9 bzw. 4.10) zur Kontrolle der Wellenlänge und des stabilen Laserbetriebs reflektiert. Dieses Licht wird, wie schon erwähnt, in ein Wavemeter und einen Spektrumanalysator eingekoppelt. Das Wavemeter (*Burleigh* WA 10) bestimmt die Wellenlänge durch einen internen Vergleich mit einem He-Ne-Laser (Genauigkeit: im roten Spektralbereich $\pm 0,003$ nm, im blauen Spektralbereich trotz besserer Spezifikation nur $\pm 0,05$ nm).

Der transmittierte Strahl (70 %) wird in eine polarisationserhaltende Einmoden-Glasfaser eingekoppelt. Mit einem Kerndurchmesser von nur ~ 5 μm stellt sie einen Tiefpassfilter dar und entspricht dem Anregungspinhole im konfokalen Aufbau. Sie liefert eine örtlich fixierte, gaußförmige TEM_{00} Mode. Auf ihre Funktionsweise wird im folgenden Unterabschnitt 4.2.1 eingegangen. Nach der räumlichen folgt die Amplitudenstabilisierung (*Cambridge Research Instrumentation*: Laser Intensity Stabilizer LS100). Intensitätsschwankungen bis zu 300 kHz können durch die Kombination eines elektrooptischen Modulators, der beim Anliegen eines elektrischen Feldes den Polarisationszustand des Lichts ändert und einen anschließenden Polarisator auf 0,1 % der Intensität minimiert werden [133]. Dies ist notwendig, da beim Durchstimmen des Lasers dessen Intensität variiert und der Strahl räumlich wandert und damit nicht immer optimal in die Faser gekoppelt wird. Mit einem Keilabschwächer (*Newport*, max. OD3) lässt sich die gewünschte Leistung bis in den nW-Bereich stufenlos und ohne Strahlversatz einstellen.

Neben der Leistung ist die Polarisation ein wichtiger Parameter des Anregungslichts. Mit einem $\lambda/2$ -Plättchen kann das linear polarisierte Laserlicht um einen beliebigen Winkel gedreht werden, wobei die Polarisationsdrehung immer um den doppelten mechanischen Winkel auftritt. Statt eines $\lambda/2$ -Plättchen wird im Experiment ein

vorhandener, doppelter Fresnel Rhombus verwendet, bei dem die Phasenverschiebung für die zwei Polarisationskomponenten durch innere Totalreflexion unter einem bestimmten Winkel entsteht [95]. Um zirkular polarisiertes Licht zu erzeugen, das keines der Dipolmomente in der Anregungsebene bevorzugt, kann ein $\lambda/4$ -Plättchen eingebaut werden. Zur kontinuierlichen Drehung der Polarisationsrichtung von linear polarisiertem Licht ohne mechanische Bewegung und damit ohne Strahlversatz wurden ein elektrooptischer Modulator und ein $\lambda/4$ -Plättchen kombiniert. Diese Einheit wurde mit G. Jung entwickelt und getestet und soll im Abschnitt 4.2.2 erläutert werden.

Bei den mikroskopischen Anwendungen spielt der Strahldurchmesser, also die Ausleuchtung der Objektivöffnung, eine Rolle für die effektive numerische Apertur. Durch Teleskope, in unserem Fall zwei, möglichst korrigierte Linsen (z.B. Doublets), die im Abstand der Summe ihrer Brennweiten aufgebaut sind (Vorzeichen bei konkaven Linsen beachten), lässt sich (nahezu) jede Strahlaufweitung erreichen. Am platzsparendsten ist die Verwendung einer konkaven und einer konvexen Linse. Der Faktor der Vergrößerung des Durchmessers entspricht genau dem Verhältnis der Brennweiten.

4.2.1 Glasfaser

Glasfasern haben nicht nur im Labor, sondern auch in der Industrie im Bereich der Datenübertragung und Telekommunikation eine große Bedeutung. Die Wellenleitung funktioniert nach dem Prinzip der inneren Totalreflexion. Das Licht wird in einem Kern mit höherem Brechungsindex n_k gegenüber dem des Mantels n_m geleitet (Abb. 4.6). Dieser Brechungsindexunterschied wird erreicht, indem SiO_2 mit GeO_2 dotiert wird. Die Faser ist von einer Schutzhülle umgeben, die mechanisch oder durch Anlösen in einer Methylenchlorid-Aceton(1:1)-Mischung entfernt werden kann, um eine saubere Eintritts- oder Austrittsfläche schneiden bzw. brechen zu können. Im Fall der verwendeten Glasfasern (Atos York HB450 (blau) bzw. HB650 (rot), single mode, polarisationserhaltend) ist der Brechungsindex des Kerns nicht konstant, sondern hat ein Gradientenprofil (Abb. 4.6 b). Der Brechungsindexunterschied beträgt nur ca. 0,01 bei einem mittleren Brechungsindex von 1,45. Die Polarisationserhaltung wird erreicht, indem der Kern mechanisch verspannt wird (graue Sektionen in Abb. 4.6 a), dadurch doppelbrechend wird, und sich durch die unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeiten die zwei senkrecht zueinander stehenden Polarisationsrichtungen unverändert fortpflanzen. Der Kern ist nicht exakt rund, sondern leicht elliptisch, ebenso wie der ausgekoppelte Lichtspot. Um die Polarisationserhaltung nutzen zu können, muss das Laserlicht in der richtigen Polarisationsrichtung

eingekoppelt werden (entweder parallel oder senkrecht zur Verspannungsrichtung, die natürlich mit dem Auge nicht sichtbar ist). Dies ist auf ca. $1\text{-}2^\circ$ genau nötig, um einen Kontrast von über $100:1$ zu erreichen, und gelingt mit einer rotierbaren (neben x-, y- und z-verschiebbaren) Faserhalterung.

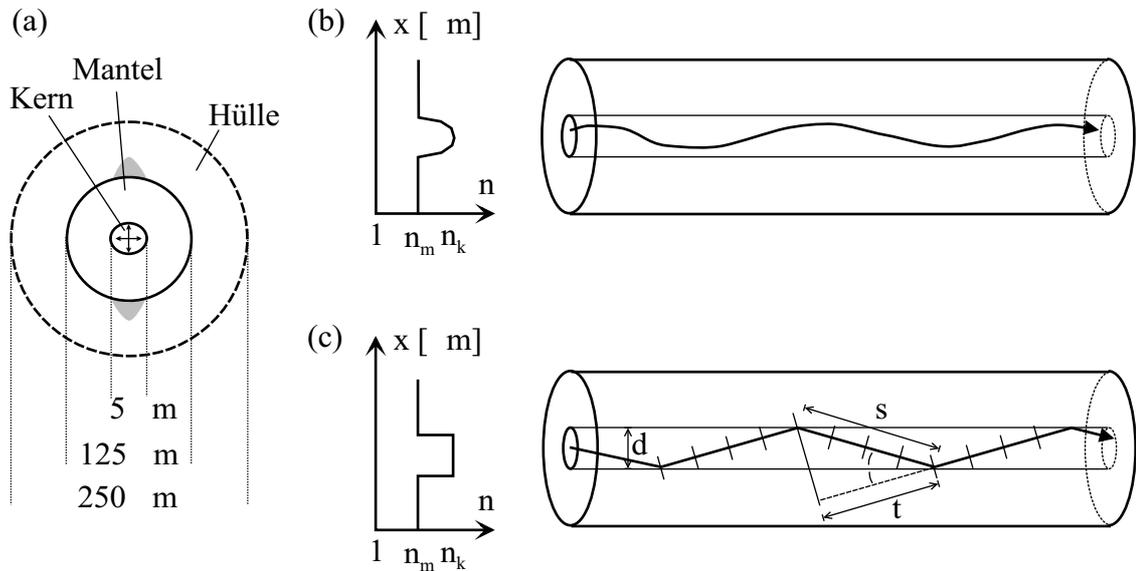


Abbildung 4.6: (a) Schnitt durch eine Glasfaser mit Kern (*core*), Mantel (*cladding*) und Hülle (*coating*). Die grauen Bereiche erzeugen die mechanische Verspannung, die zur Polarisationserhaltung führt (nicht maßstäblich). (b) Lichtausbreitung bei einem Gradientenprofil. (c) Lichtreflexion bei einem Stufenprofil.

Um die Unterscheidung zwischen *multimode* und *single mode* Fasern zu verstehen, soll die Ausbreitung des Lichts in einer Faser mit Stufenprofil betrachtet werden [137]. Anhand von Abb. 4.6 c sieht man, dass es für unterschiedliche Winkel α zwischen der Lichtausbreitungsrichtung (die Wellenfronten sind als kurze Striche eingezeichnet) und der Faserrichtung zu Interferenzerscheinungen innerhalb des Kerns kommt. Die Interferenz ist konstruktiv, wenn der Wegunterschied zwischen einem direkten und einem zweifach reflektierten, parallelen Teilstrahl ein vielfaches der Wellenlänge ist. Mit den Bezeichnungen der Abbildung lässt sich das als $s - t = m\lambda$ ($m = 1, 2, \dots$) formulieren. Unter Verwendung der geometrischen Beziehungen $s = d / \sin \alpha$ und $t = s \cos(2\alpha)$ sind die Winkel α_m konstruktiver Interferenz festgelegt durch:

$$\sin \alpha_m = \frac{m \lambda}{2d} \quad (4.7)$$

Eine Faser leitet nun alle Moden m , deren α_m kleiner als der Totalreflexionswinkel

α'_t ist ($\sin(90^\circ - \alpha'_t) = n_m/n_k$; die Definition der Winkel α ist hier als Winkel zur brechenden Fläche und nicht zum Lot gewählt):

$$\sin \alpha_m < \sin \alpha'_t = \sqrt{1 - \frac{n_m}{n_k}} \approx \sqrt{\frac{\Delta n}{\bar{n}}} \quad (4.8)$$

Erfüllen mehrere Moden diese Bedingung, so handelt es sich um eine *multimode* Faser, gilt sie nur für ein m , so spricht man von einer *single mode* Faser. Zur Erreichung der *single mode* Eigenschaft für eine bestimmte Wellenlänge λ kann neben den Brechungsindizes vor allem der Kerndurchmesser d variiert werden. Ist er klein genug, so ist für $m = 1$ die Bedingung noch erfüllt, für $m = 2$ aber schon nicht mehr. Typische Kerndurchmesser von *single mode* Fasern sind $5 \mu\text{m}$. Die Grenzwellenlänge einer Faser wird als *cut-off* Wellenlänge bezeichnet. Verwendet man Licht kürzerer Wellenlängen, treten mehrere Moden auf, verwendet man längere Wellenlängen, lässt sich weniger Licht durch die Faser leiten. Die optimale Wellenlänge ist knapp über der *cut-off* Wellenlänge λ_{co} . Zur Übertragung des Laserlichts zum eigentlichen Experiment wird eine Faser mit $\lambda_{co} \approx 430 \text{ nm}$ verwendet, da sie im ganzen sichtbaren Spektralbereich nur eine Mode transmittiert und auch im roten Spektralbereich nach der Transmission noch genügend Leistung für das Experiment zur Verfügung steht. Die Verluste treten bei den im Labor auftretenden Längen von nur wenigen Metern im Wesentlichen bei der Ein- und Auskopplung auf. Man erreicht Transmissionen von 2 % (rotes Licht durch blaue Faser) bis 30 % (bei sauberem Strahlprofil und geeigneter Faser).

Durch den Grenzwinkel der Totalreflexion ist auch die numerische Apertur NA der Faser gegeben, die zur Einkopplung beachtet werden muss. Es reicht nicht, den Laserstrahl irgendwie auf den Kerndurchmesser zu fokussieren, es dürfen vielmehr keine Winkel größer als der Totalreflexionswinkel auftreten. Solche Strahlen würden zwar im Mantel noch etwas geleitet, würden aber nicht an der gewünschten Stelle aus der Faser austreten. Die NA der verwendeten Fasern sind 0,13 (HB450) bzw. 0,16 (HB650). Eine Spotgröße kleiner als $5 \mu\text{m}$ ist mit diesen NA immer noch möglich. Zur Einkopplung wurde im Labor ein Mikroskopobjektiv mit Vergrößerung $10\times$ und $NA=0,25$ verwendet, das jedoch nicht vollständig ausgeleuchtet wurde, um die richtige NA zu erreichen. Zum Auskoppeln wurde ein Objektiv mit Vergrößerung $40\times$ und $NA=0,65$ verwendet, um einen dünnen Strahl zu erzeugen, der an der Apertur des Intensitätsstabilisators (2 mm) nicht abgeschnitten wird. Störende Effekte der Glasfaser wie Ramanstreuung oder Anregung von Farbzentren konnten nicht nachgewiesen werden. Bei Laserbetrieb im blauen Spektralbereich trat allerdings starkes Untergrundsignal um $530 (\pm 20) \text{ nm}$ bei den Energietransferuntersuchungen unter Verwendung des Faseraufbaus (und nur in diesem Fall) auf.

4.2.2 Polarisationsdrehung

Die Polarisation des Anregungslichts ist wegen der Dipoleigenschaften einzelner Moleküle eine geeignete Quelle, um deren Orientierung zu bestimmen und gegebenenfalls auch Orientierungswechsel nachzuweisen. Ist die Polarisationsrichtung parallel zum Übergangsdipolmoment, so wird das Molekül maximal angeregt, ist sie senkrecht dazu, so wird das Molekül nicht angeregt.

Die Technik zur Drehung der Polarisationsrichtung des Lichts mit einem $\lambda/2$ -Plättchen oder einem doppelten Fresnel-Rhombus wurde zu Beginn des Abschnitts 4.2 schon kurz erwähnt und wird hier zur Erklärung der Vorrichtung zur kontinuierlichen Drehung von linear polarisiertem Licht noch detaillierter erläutert. Die Drehung kommt dadurch zustande, dass zwei, zueinander senkrechte Polarisationskomponenten des Strahls durch Doppelbrechung oder Totalreflexion unter geeignetem Winkel eine Phasenverschiebung von $\lambda/2$ bzw. π erfahren. Die Komponenten liegen parallel bzw. senkrecht zur Vorzugsrichtung des optischen Elements. Die neue Polarisationsrichtung liegt spiegelbildlich zu einer dieser Richtungen. Bei Drehung des optischen Elements dreht sich die Polarisation um den doppelten Winkel.

Das mechanische Drehen kann jedoch zu einem Strahlversatz führen und ist nur mit einer begrenzten Geschwindigkeit möglich. Aus diesem Grund wurde eine Anordnung entwickelt, die die Polarisationsrichtung durch eine rampenförmige Spannung kontinuierlich dreht. Sie besteht aus einem elektrooptischen Modulator (EOM, *Gsänger* LM 0202) und einem $\lambda/4$ -Plättchen (oder Fresnel-Rhombus) und ist in Abb. 4.7 dargestellt. Der EOM funktioniert nach dem transversalen elektrooptischen Effekt. Ein senkrecht zur Lichtausbreitungsrichtung angelegtes elektrisches Feld führt zur Änderung der Doppelbrechung in einem Ammonium-Dihydrogen-Phosphat (ADP) Kristall. Der EOM wird mit einer Feldrichtung im 45° Winkel zur Lichtpolarisation eingebaut und kann beliebige Phasenverschiebungen zwischen den Komponenten parallel und senkrecht zum elektrischen Feld erzeugen, indem die angelegte Spannung verändert wird. Für eine gewisse Offset-Spannung U_0 , die die natürliche Doppelbrechung ausgleicht, tritt linear polarisiertes Licht unverändert aus dem EOM aus. Erhöht man die Spannung, so tritt Phasenverschiebung auf und das austretende Licht ist elliptisch polarisiert (siehe Abb. 4.7). Erhöht man die Spannung weiter bis zur $\lambda/4$ -Spannung, so erhält man zirkular polarisiertes Licht. Bei weiterer Zunahme der Spannung ist das den EOM verlassende Licht elliptisch polarisiert, bis es bei der $\lambda/2$ -Spannung (zuzüglich U_0) wieder linear polarisiert ist, jedoch um den Winkel von 90° verdreht. Für die Phasenverschiebung des EOM $\Delta\varphi_v$

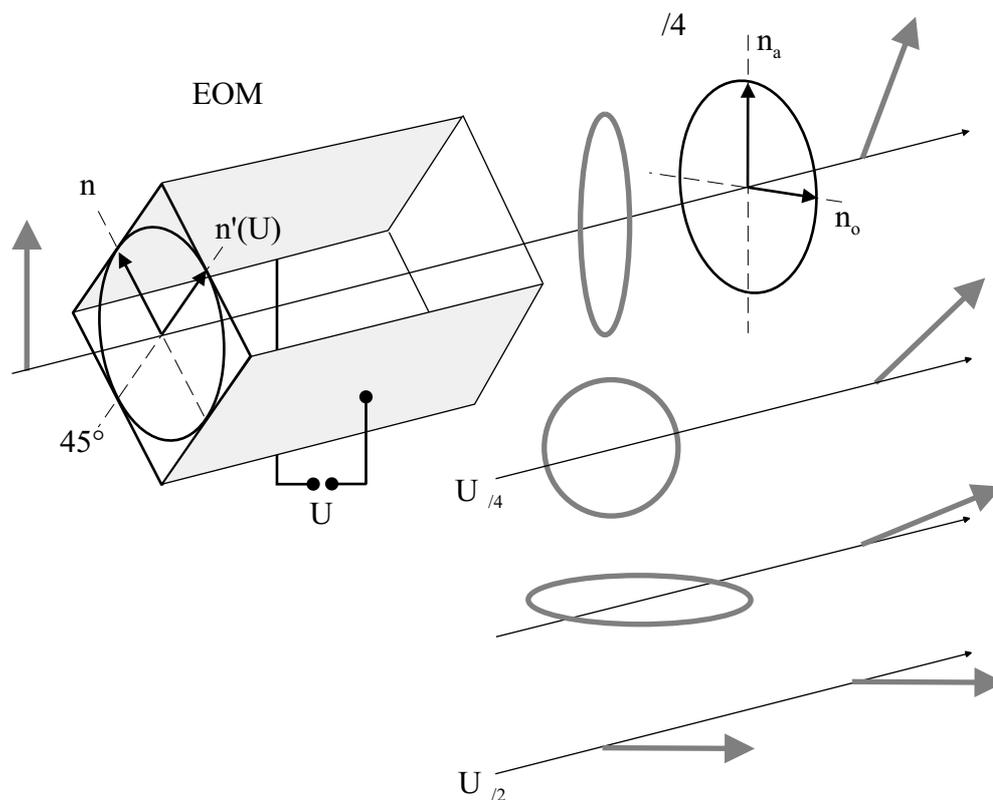


Abbildung 4.7: Anordnung des elektrooptischen Modulators und des $\lambda/4$ -Plättchens zur Drehung von linear polarisiertem Licht. Näheres siehe Text.

gilt folgende Proportionalitätsbeziehung [136]:

$$\Delta\varphi_v \propto \frac{U}{\lambda} \quad (4.9)$$

Eine lineare Veränderung der Spannung führt damit zu einer linearen Phasenverschiebung. Bei 488 nm und $U = 160$ V ($\lambda/2$ -Spannung) ist die Phasenverschiebung genau π .

Baut man hinter den EOM ein $\lambda/4$ -Plättchen ein, dessen Achse parallel zur ursprünglichen Polarisationsrichtung des Lichts ist, so erhält man bei jeder angelegten Spannung wieder linear polarisiertes Licht. In jenen Fällen, in denen das Licht nach dem EOM linear polarisiert ist, ist das trivial, weil die Polarisations Ebenen mit einer der beiden Vorzugsachsen des $\lambda/4$ -Plättchens zusammenfallen und damit unverändert bleiben. Im Fall der $\lambda/4$ -Spannung ist dies auch einfach nachzuvollziehen, da das zirkular polarisierte Licht um $\lambda/4$ phasenverschoben wird und damit zu linear polarisiertem Licht wird, dessen Polarisationsrichtung im 45° Winkel zu den

Vorzugsachsen $\lambda/4$ -Plättchen liegt. Für Spannungen zwischen diesen kann man es sich analog überlegen oder mit dem Vektor- und Matrizenformalismus nach Jones berechnen [95]. Danach geht man (analog zu Abb. 4.7) von in y-Richtung polarisiertem Licht aus. Auf den Vektor $\begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$, der diesen Polarisationszustand beschreibt, muss zunächst die Matrix $\begin{pmatrix} \sin 45^\circ & -\cos 45^\circ \\ \cos 45^\circ & \sin 45^\circ \end{pmatrix}$ zur effektiven Drehung des Koordinatensystems um 45° angewendet werden ($\sin 45^\circ = \cos 45^\circ = \sqrt{2}/2$), bevor die Wirkung der Phasenverschiebung des EOM um $\Delta\varphi_v$ ($\Delta\varphi_v : 0 \rightarrow 2\pi$ für $U : 0 \rightarrow U_\lambda$) in Form der Matrix $\begin{pmatrix} e^{i\Delta\varphi_v/2} & 0 \\ 0 & e^{-i\Delta\varphi_v/2} \end{pmatrix}$ in die Rechnung eingeht. Anschließend wird das Koordinatensystem durch Multiplikation mit $\begin{pmatrix} \sin 45^\circ & \cos 45^\circ \\ -\cos 45^\circ & \sin 45^\circ \end{pmatrix}$ im mathematischen Sinne zurückgedreht und der Effekt des $\lambda/4$ -Plättchens durch die Matrix $\begin{pmatrix} e^{i\pi/2}(=i) & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$ einbezogen. Als Ergebnis erhält man den gewünschten Vektor $\begin{pmatrix} \sin(\Delta\varphi_v/2) \\ \cos(\Delta\varphi_v/2) \end{pmatrix}$, der um den Winkel $\Delta\varphi_v/2$ gedrehtes, linear polarisiertes Licht darstellt. Einzelne Polarisationszustände sind in Abb. 4.7 dargestellt und veranschaulichen, dass die Anordnung tatsächlich das Geforderte leistet.

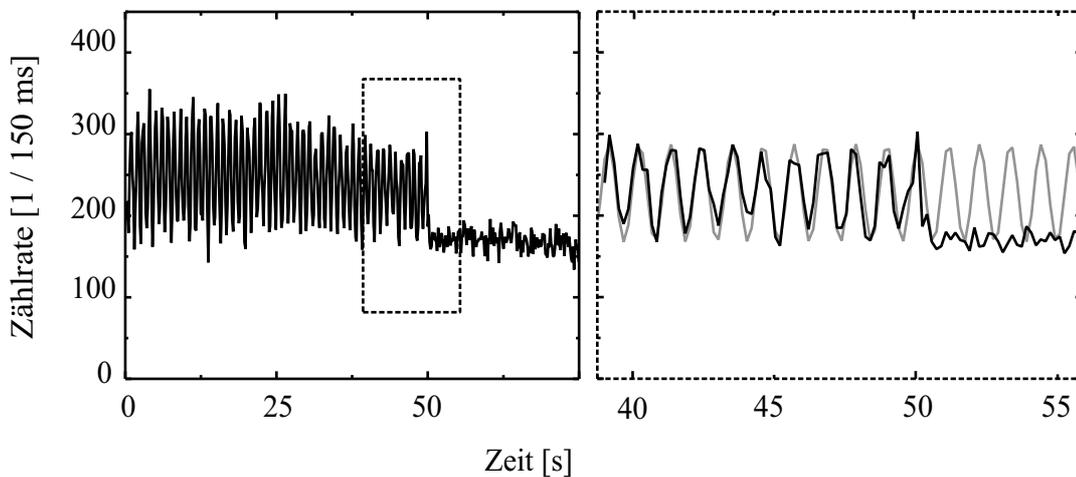


Abbildung 4.8: Zeitspur eines Terrylendiimid-Moleküls in Polyvinylbutyral unter Drehung der Anregungspolarisation mit 1 Hz (Drehung um $180^\circ/\text{s}$, $\lambda_{exc} = 633\text{nm}$, $U_0 \approx 180\text{ V}$, $U_{\lambda/2} \approx 210\text{ V}$). Die Fitfunktion lautet $y = y_0 + A \cos^2(f\pi t - \phi_0)$ (freundlicherweise von G. Jung zur Verfügung gestellt).

Der Effekt der kontinuierlichen Polarisationsdrehung des Anregungslichts wurde an einzelnen Molekülen zusammen mit G. Jung getestet. Am EOM wurde eine ram-

penförmige Spannung zwischen U'_0 und $U'_0 + U_\lambda$ ($< 500\text{V}$) der Frequenz $f = 1$ Hz mit Hilfe eines Frequenzgenerators (*Wavetek*, Mod. 22, 11 MHz, Stab. Sweep Generator) und eines Verstärkers (*Piezomechanik Pickelmann*, SQV1/500, $\times 100$, 0 - 500 V, für kapazitive Lasten) angelegt. Das Signal des räumlich starren Moleküls zeigt das erwartete $\cos^2 \varphi$ Verhalten, bis der Farbstoff ausbleicht (Abb. 4.8). Durch die Kenntnis des Polarisationszustandes des Lichts kann auf die Orientierung des Moleküls in der Probe geschlossen werden.

4.3 Der Linsen- und Faseraufbau

Die Experimente der ersten Phase dieser Doktorarbeit wurden an spektral isolierten Einzelmolekülen bei tiefen Temperaturen durchgeführt. Um die benötigten tiefen Temperaturen zu erreichen, wurden die Proben in einem Bad-Durchfluss-Kryostaten (*Janis Research* Kryostat SVT-200-4) mit flüssigem Helium gekühlt. Im Badbetrieb ist die Probe in direktem Kontakt mit flüssigem Helium. Dazu werden 13 % des Heliumtankinhalts über ein Nadelventil in den Probenraum gelassen, nachdem flüssiges He in der Mitte der Fenster sichtbar war. Durch Abpumpen des He-Gases über der Flüssigkeit (Druck < 1 mbar) lassen sich Temperaturen zwischen 4,2 und 1,4 K erreichen. Im Durchflussbetrieb bleibt das Nadelventil ständig leicht geöffnet. Mit einer Heizung und einem Temperaturregelkreis (*Lake Shore* DRC 91 CA) lassen sich beliebige Temperaturen zwischen 2 und 300 K einstellen. Ein Temperatursensor (Silizium Diode, *Lake Shore* DT-470-CU-13) ist in Probennähe angebracht, da bei Temperaturveränderungen sich erst nach mehreren Minuten ein Gleichgewichtszustand einstellt und starke Temperaturgradienten auftreten können. Zum Einfüllen des flüssigen Heliums aus der Kanne in den Tank des Kryostaten ist ein Überdruck von ca. 50 mbar in der Kanne zu erzeugen, damit das flüssige Helium (Dichte 0,13 kg/l bei 4 K) im Heber steigen kann.

Zur Probenhalterung stehen zwei Aufbauten [128, 129] zur Verfügung: der Linsen- [17] und der Faseraufbau [13]. Beide sind in Abb. 4.9 mit Anregungs- und Detektionselementen dargestellt. Es wird jeweils ein Probenvolumen von $(5 \mu\text{m})^2 \times$ Probendicke beleuchtet.

Beim Faseraufbau wird der Laserstrahl außerhalb des Kryostaten in eine polarisationserhaltende *single mode* Glasfaser eingekoppelt, die ins Innere des Kryostaten führt. Am Ende der Faser befindet sich die Probe, die in Form eines dünnen Polymerfilmes mit einem nicht-fluoreszierenden Klebstoff (*Uhu* Sekundenkleber Gel) ans Ende der Faser geklebt wird oder nach Eintauchen in eine Lösung in Form einer dünnen Schicht am Faserende haftet. Der Aufbau ist technisch einfach und bedie-

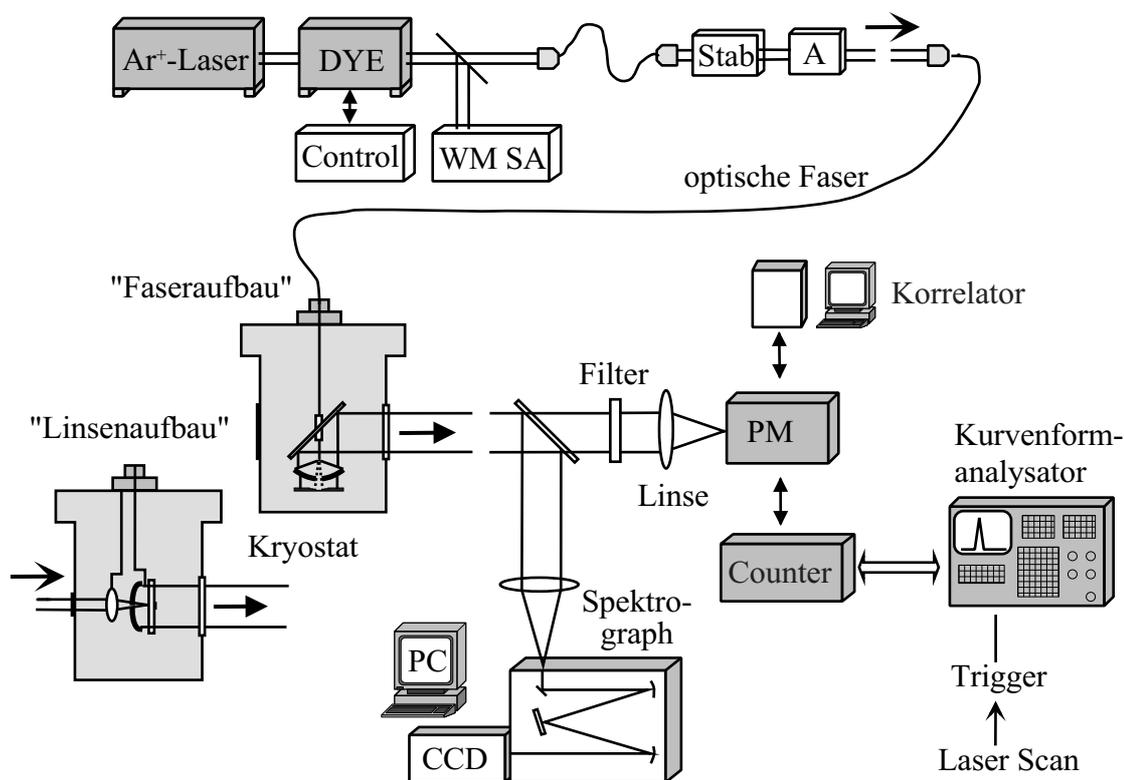


Abbildung 4.9: Faser- und Linsenaufbau zur Einzelmoleküldetektion bei tiefen Temperaturen (Abkürzungen: WM Wavemeter, SA Spektroanalysator, Stab Leistungsstabilisator, A Abschwächer, PM Photomultiplier).

nungsfreundlich, aber sowohl die beleuchtete Probenstelle als auch die Anregungspolarisation sind durch den Faserkern festgelegt und können nicht variiert werden. Er eignet sich für amorphe und polykristalline Proben, in denen Farbstoffmoleküle verschiedenster räumlicher Orientierungen auftreten, auch solche, deren Übergangsdipolmomente günstig zur festen Polarisationsrichtung des Laserfeldes liegen. Eine Verschiebeeinheit erlaubt die Positionierung der Probe im Brennpunkt eines Parabolspiegels (siehe Abb. 4.9), der das Fluoreszenzlicht über fast den halben Raumwinkelbereich von 2π aufammelt. Der Parabolspiegel besitzt eine zentrale Bohrung, um das Anregungslicht räumlich zu trennen. Der parallele Strahl des Fluoreszenzlichts wird um 90° abgelenkt und durch ein Kryostatenfenster nach außen geleitet.

Der Linsenaufbau ist flexibler bezüglich Variation der untersuchten Probenstelle und Veränderung der Polarisationsrichtung, dafür aber auch schwerer zu justieren. Hierbei wird das Anregungslicht direkt durch ein Kryostatenfenster auf die Probe gestrahlt. Die Probe ist auf einem oder zwischen zwei LiF-Plättchen bzw. Objektträgern befestigt. Die Fokussierung gelingt mit einer Linse ($f=10\text{ mm}$), deren Ob-

jektweite mechanisch (grob) und elektromagnetisch (fein) eingestellt werden kann. Die beleuchtete Probestelle kann auf zwei Arten verändert werden: durch einen μm -Tisch mechanisch in der Höhe und seitlich, indem der Laserstrahl durch eine Translationseinheit ([128], nicht in Abb. 4.9 eingezeichnet) verfahren wird. Das Anregungslicht wird geblockt, und das Fluoreszenzlicht mit einem Parabolspiegel aufgesammelt.

Zur Aufnahme eines Fluoreszenzanregungsspektrums wird der Laser in der Frequenz verstimmt, das Anregungsstreulicht mit einem Langpassfilter geringer Eigenfluoreszenz spektral abgetrennt und das Fluoreszenzlicht auf die Kathode eines Peltiergekühlten Photomultipliers (PM, *Burle* C31034-02A, Dunkelzählrate < 20 C/s, max. Zählrate 100.000 C/s, Kathodenspannung ~ -1700 V) abgebildet. Wegen der eingeschränkten optischen Qualität des Parabolspiegels ist ein derartiger Detektor mit großer empfindlicher Fläche notwendig. Die Ausgangspulse des Multipliers werden vorverstärkt (*Stanford Research*, SRS 412) und an ein Photonenzählsystem (Counter, *Stanford Research*, SR400, Diskriminator Level -70 mV für PM) gegeben. Dieses gibt ein Analogsignal an den Transientenrekorder (*Analogic* DT 6100) weiter, der die Werte der einzelnen Messintervalle speichert, sobald er als Startsignal bei Beginn des Laserscans einen Triggerpuls direkt von der Kontrollelektronik des Farbstofflasers erhalten hat.

Nachdem in Fluoreszenzanregungsspektren einzelne Moleküle isoliert wurden, kann das Fluoreszenzsignal auch korreliert werden oder dessen spektrale Verteilung detektiert werden. Zur Aufnahme von Korrelationsfunktionen wird das Signal des PM über einen Verstärker (Eigenbau der Elektronikwerkstatt) direkt an eine digitale Korrelatorkarte gegeben (*ALV* 5000, Kathodenspannung am PM von -1400 V nötig). Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wird ein Teil des Fluoreszenzlichts an einem Strahlteiler reflektiert und auf den Eintrittsspalt eines Spektrographen (*Jobin Yvon* HR460) abgebildet. Das Fluoreszenzlicht wird am Gitter (Zwei Typen: 1800 Striche/mm, simultan detektierbarer Spektralbereich ca. 12 nm, typ. Auflösung 4 cm^{-1} ; 150 Striche/mm, simultan detektierbarer Spektralbereich ca. 150 nm, typ. Auflösung 30 cm^{-1}) dispergiert und mit einer CCD (*charge-coupled device*) Kamera detektiert (*Princeton Instruments*, Chip: *Tektronix*, flüssig Stickstoff gekühlt, 512×512 Pixel, back illuminated, 16 bit, Pixelgröße $24\ \mu\text{m}$, Quantenausbeute $> 60\%$ zwischen 400 und 800 nm).

4.4 Das konfokale Laserscanning-Mikroskop

4.4.1 Überblick über die Apparatur

Die Ausdehnung der spektral hochauflösenden Einzelmolekülexperimente auf neue Farbstoff-Matrix-Systeme scheitert meist an zu breiten Absorptionslinien der Chromophore. Es muss deshalb mit mikroskopischen Techniken räumliche Auflösung innerhalb des Kryostaten erreicht werden. Zum Erreichen einer hohen Einsammeleffizienz muss das Objektiv bzw. eine geeignete Linse zudem sehr nahe an der Probe und damit im Inneren des Kryostaten sitzen. Zur besseren Unterdrückung von Streuuntergrund und zum Erreichen hoher räumlicher Auflösung wurde das konfokale Prinzip gewählt, das um einen Imaging-Modus erweitert werden kann [138]. Der im konfokalen Betrieb notwendige Rasterscan kann durch Verfahren der Probe oder des Laserstrahls erreicht werden. Das beschränkte Platzangebot im Probenrohr mit einem Durchmesser von 2" (≈ 5 cm) lässt jedoch kaum Spielraum für einen Scantisch, zudem reduziert sich der zur Verschiebung genutzte piezoelektrische Effekt bei den tiefen Temperaturen auf etwa 20 %, so dass Scanbereiche kaum über 10 μm erreicht werden können. Deshalb wurde das Scannen des Laserstrahls realisiert, das zwar höhere Ansprüche an die Optik stellt, wobei aber alle zugehörigen Komponenten außerhalb des Kryostaten aufgebaut und jederzeit verändert werden können. Scanbereiche bis zu 100 μm stellen kein Problem dar.

In Abb. 4.10 wird ein Überblick über die gesamte Apparatur des konfokalen Laserscanning-Mikroskops gegeben. Ein Laserstrahl geeigneter Frequenz, Polarisation und Intensität wird an einem dichroitischen Strahlteiler reflektiert. Mit Hilfe zweier beweglicher Spiegel kann der Laserstrahl verkippt werden. Die Spiegel liegen sehr nahe zusammen, so dass man näherungsweise einen Drehpunkt für beide Ablenkrichtungen annehmen kann. Mit einem telezentrischen System wird der Drehpunkt in das Objektiv abgebildet. Die Probe befindet sich in der Fokusebene des Objektivs. Das Fluoreszenzlicht wird mit demselben Objektiv aufgesammelt und passiert bis zum dichroitischen Strahlteiler denselben Weg wie das Anregungslicht. Nachdem es ebenfalls durch die Scanspiegel reflektiert wurde, ist es wieder örtlich fixiert und unabhängig von der vorhandenen Spiegelstellung. Wegen der längeren Wellenlänge des Fluoreszenzlichts transmittiert es den dichroitischen Strahlteiler und wird danach mit Langpass-, Bandpass- oder Notchfiltern spektral gefiltert. Anschließend wird es auf das Detektionsspinhole fokussiert, damit räumlich gefiltert, und mit einer Avalanche Photodiode (APD) detektiert.

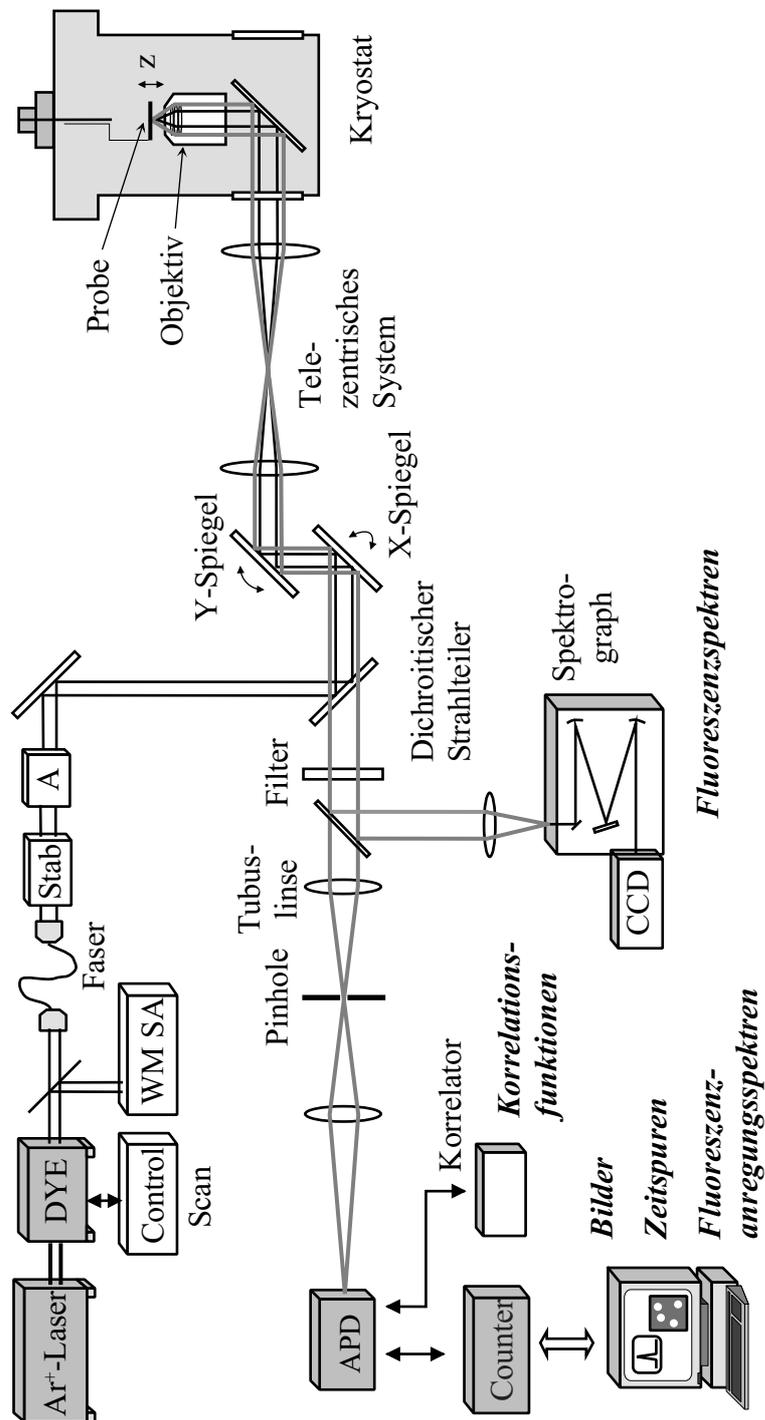


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops (Abkürzungen: WM Wavemeter, SA Spektrenanalysator, Stab Leistungsstabilisator, A Abschwächer, APD Avalanche Photodiode).

4.4.2 Laserscanning und telezentrisches System

Zum Erreichen räumlicher Auflösung wird der Laserstrahl durch zwei Galvanometerspiegel hochpräzise verkippt. Alternativ werden in der Literatur akustooptische Deflektoren verwendet oder ein einzelner Spiegel, der mit Hilfe zweier Schrittmotoren und kardanischer Halterung direkt in zwei orthogonale Raumrichtungen verkippt werden kann. Mit der letzten Methode hat man nur einen Drehpunkt für beide Achsen, man ist jedoch in der Scangeschwindigkeit beschränkt. Zudem sind die Schrittmotoren, im Gegensatz zu Galvanometerscannern, die auch in kommerziellen Geräten verwendet werden (z.B. von *Zeiss* oder im *Coherent* Farbstofflaser), nicht auf kontinuierlichen Scanbetrieb optimiert.

Die verwendeten Galvanometerspiegel (*General Scanning M2*, bezogen mit Regel-elektronik über Fa. *Arges*) haben bei maximalen Auslenkwinkeln von $\pm 15^\circ$ ($\pm 30^\circ$ optisch) eine Wiederholgenauigkeit von $12 \mu\text{rad}$, eine Nicht-Linearität von unter 0,05 % und eine Einstellwartezeit von ca. 1 ms bei kleinen Winkeländerungen. Silberbeschichtete Spiegel der Apertur 20 mm sind dazu jeweils auf einer Achse befestigt, die in einer steifen Lagerung mit hochwertigen Kugellagern läuft und durch die elektromagnetischen Kräfte einer Spule bewegt wird. Kapazitive Sensoren kontrollieren die aktuelle Position und regeln sie in einem geschlossenen Regelkreis nach. Die gewünschte Position kann durch Anlegen einer Analogspannung gesteuert werden.

Das Problem der zwei getrennten Drehpunkte wurde verringert, indem die beiden Spiegel so nah wie möglich aneinander positioniert wurden. Exakte Lösungen hätten zusätzliche optische Elemente erfordert, die unerwünscht sind. Der gewünschte Drehpunkt zum Abrastern des Probenbereichs muss aber im Objektiv liegen. Dazu muss der gedachte mittlere Drehpunkt des Scanners in das Objektiv abgebildet werden. Gleichzeitig soll aber auch der parallele Strahlengang erhalten bleiben. Um diese beiden Anforderungen zu erfüllen, benötigt man zwei abbildende Elemente, die ein telezentrisches System bilden.

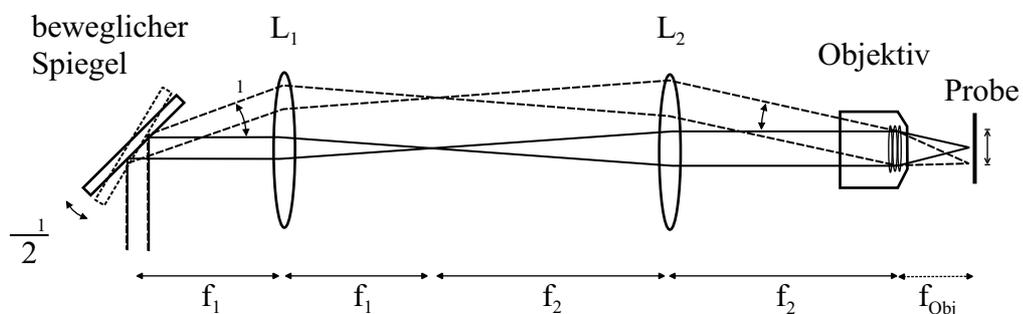


Abbildung 4.11: Aufbau und Abstände im telezentrischen System.

Wie der Name schon sagt, besteht es aus einem Teleskop, also zwei Linsen im Abstand ihrer Brennweiten. Damit ist die Forderung nach der Erhaltung des parallelen Strahls erfüllt. Das Teleskop ist darüber hinaus so angeordnet, dass die gewünschte Abbildung des Drehpunkts in das Objektiv realisiert ist. In paraxialer Näherung ($\sin \alpha \approx \alpha$) kann die Abbildung mit dem Gaußschen Matrizenformalismus berechnet werden. Der Winkel α und der Abstand x eines Teilstrahls bilden dabei einen Vektor. Die Komponenten α und x des Vektors am Ausgangspunkt werden mit 1 indiziert, die am Endpunkt mit 2. Die Veränderung der beiden Parameter bei Translation und Brechung an einer Linse wird durch Matrizenmultiplikation $\begin{pmatrix} \alpha_2 \\ x_2 \end{pmatrix} = M \begin{pmatrix} \alpha_1 \\ x_1 \end{pmatrix}$ berechnet. Die Matrix für eine Translation um die Strecke s ist $M_T = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ s & 1 \end{pmatrix}$, die entsprechende für die Brechung an einer (dünnen) Linse mit Brennweite f ist $M_B = \begin{pmatrix} 1 & -\frac{1}{f} \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$. Zur Berechnung der gesamten Abbildung müssen die Matrizen in der richtigen Reihenfolge von links multipliziert werden. Damit der resultierende Winkel α_2 unabhängig von x_1 ist, also der Winkel für Randstrahlen nicht anders ist als für zentrale Strahlen, muss der Abstand der Linsen zwingend die Summe ihrer Brennweiten sein. Damit x_2 unabhängig von α_1 ist, also der Spot im Objektiv für verschiedene Winkel seine Größe nicht ändert, ist die Anordnung des Teleskops relativ zu Scanner und Objektiv festgelegt. Mit den Scanspiegeln bzw. dem Objektiv im Abstand der Brennweite der nächststehenden Linse des Teleskops (wie in Abb. 4.11) ist diese zweite Bedingung hinreichend und sinnvoll erfüllt, diese Anordnung ist aber nicht zwingend notwendig. Mit dem Matrizenformalismus erhält man schließlich bei Einbeziehung der richtigen Abstände:

$$\begin{aligned} \alpha_2 &= -\frac{f_1}{f_2} \alpha_1 \\ x_2 &= -\frac{f_2}{f_1} x_1 \end{aligned} \tag{4.10}$$

Die Brennweiten der telezentrischen Linsen wurden zu $f_1 = 120$ mm und $f_2 = 200$ mm gewählt. Dies hat im Wesentlichen geometrische Gründe, die u. a. durch den langen Weg von der zweiten Linse in den Kryostaten bis zum Objektiv verursacht sind. Wegen Gl. 4.10 wird dadurch der effektive optische Winkel der Scanspiegel α_1 um den Faktor $\frac{120}{200}$ verkleinert, womit sich die effektive Spiegelpositioniergenauigkeit erhöht. Gleichzeitig wird der Strahl um den reziproken Faktor $\frac{200}{120}$ aufgeweitet. Als Linsentypen wurden achromatische Doublets verwendet, die durch die Kombination zweier Linsen aus hoch- und niederbrechendem (Flint- und Kron-) Glas sowohl chromatisch als auch sphärisch korrigiert sind. Die versetzten Drehpunkte der beiden

Scanspiegel können damit jedoch nicht ausgeglichen werden. Die Bildpunkte liegen um den Faktor $(\frac{200}{120})^2$ verstärkt sogar noch weiter auseinander. Für die Position des Objektivs wird die Mitte der für x- bzw. y-Ablenkung optimalen Orte gewählt. Beim Scannen des Strahls führt das jedoch zu einer seitlichen Bewegung des Strahls im Objektiv. Das Ausmaß dieser Bewegung ist beim größtmöglichen Scanbereich ca. 1 mm. Aufgrund des Stahldurchmessers von ca. 6 mm ist das nur eine geringfügige Störung, die nur im Randbereich des Scans bemerkbar ist.

Der effektive Scanbereich Δx hängt vom maximalen Winkel α_2 und der Brennweite des Objektivs f_{Obj} ab

$$\Delta x = \Delta\alpha f_{Obj} \quad (4.11)$$

($\Delta\alpha = 2\alpha_{2max}$) und sollte in der Größe von 100 μm oder darüber liegen. Mit $f_{Obj} = 2,9$ mm lässt sich der für $\Delta x = 100\mu\text{m}$ nötige maximale optische Winkelbereich $2\alpha_{1max}$, der durch Verkippung der Spiegel überstrichen wird, berechnen zu $3,3^\circ$ (57 mrad). Daraus lassen sich der nötige Linsendurchmesser sowie alle für den restlichen Strahlengang nötigen Aperturen bestimmen.

Die kleinste Schrittweite im Raster-Scan sollte deutlich kleiner sein als die Auflösung des Objektivs. Fordert man konkret 20 Schritte für die zu erwartende Auflösung von ca. 0,5 μm (also Schrittweiten von 25 nm auf der Probe), so muss α_1 für jeden Schritt um $8 \cdot 10^{-4}$ Grad (14 μrad) verändert werden. Dies liegt in der Größenordnung der Wiederholgenauigkeit der Galvanometerspiegel.

4.4.3 Objektiv und Probenhalterung

Das für die optische Qualität wichtigste Element ist das Objektiv, dessen richtige Wahl eines der Hauptprobleme beim Aufbau eines Tieftemperaturmikroskops darstellt. Da Immersionsflüssigkeiten bei den tiefen Temperaturen einfrieren, kommt nur ein Trockenobjektiv in Frage. Es sollte eine möglichst hohe NA haben, achromatisch auf unendliche Tubuslänge korrigiert sein und keine geklebten oder verkitteten Linsen beinhalten. Ein derartiges Objektiv (60 \times , NA 0,85, $f=2,9$ mm, Arbeitsabstand 0,45 mm) wurde von *Melles Griot* angeboten und bezogen, wobei sich herausstellte, dass auch bei diesem Objektiv Linsenpaare verklebt waren und die Klebstoffschichten nach dem Abkühlen Risse zeigen. Als Kompromisslösungen müssen asphärische Linsen, *Solid Immersion Lenses* und Reflexionsobjektive in Betracht gezogen werden.

Zur Halterung des Objektivs und der Probe wurde ein Stab zum Einbau in den Kryostatentwurf entworfen, der die Positionsänderung der Probe in z -Richtung im sub- μm Bereich erlaubt. Dazu wurde die Probenhalterung auf einem Edelstahl-Verschiebetisch

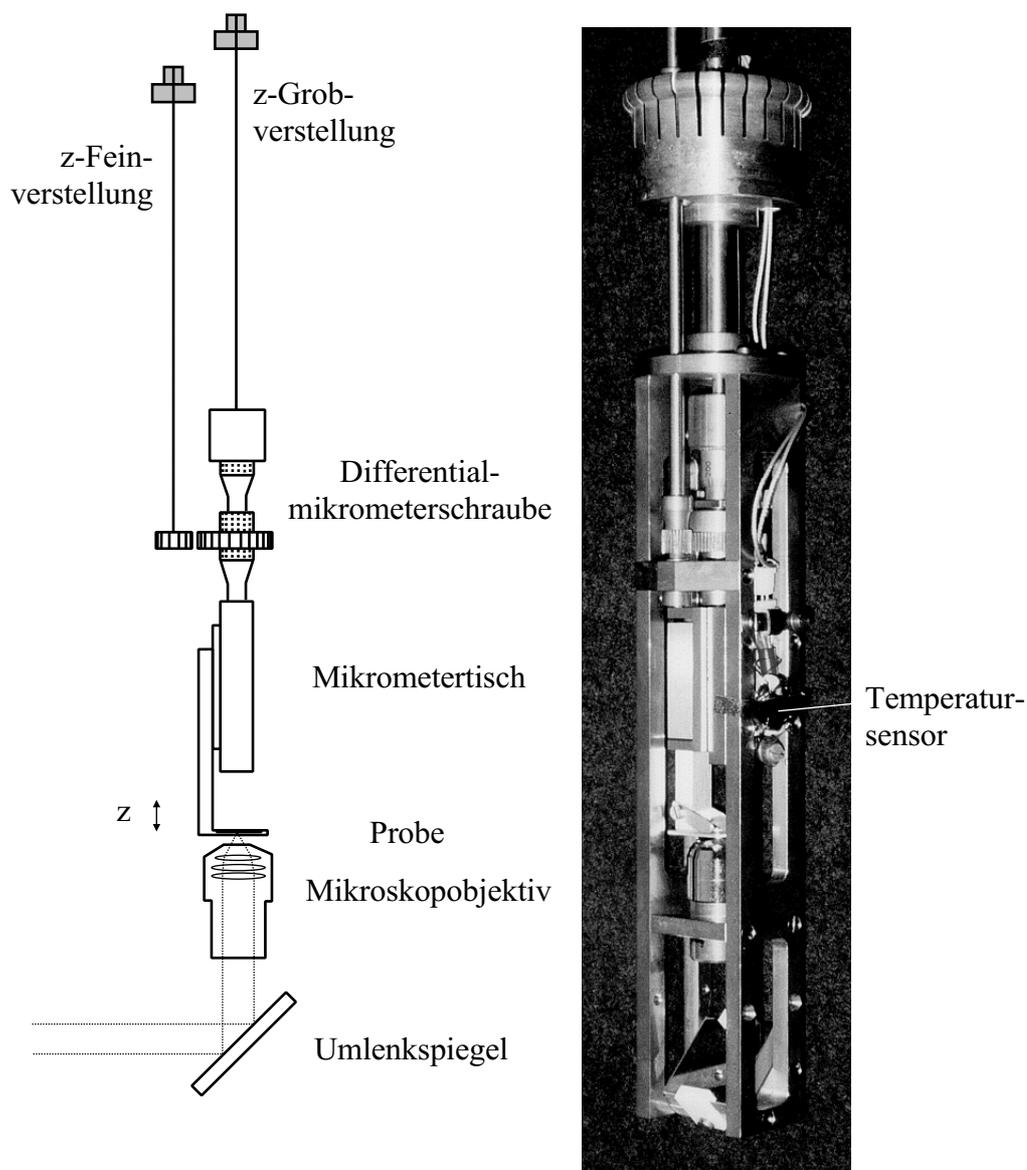


Abbildung 4.12: Schematischer und tatsächlicher Aufbau des Probenstabs.

(Newport) befestigt, der mit einer Differentialmikrometerschraube verstellt werden kann. Die Grobverstellung ($500 \mu\text{m}/\text{Umdr.}$) kann über eine Stange von außen verändert werden, ebenso wie die Feinverstellung, die durch eine Zahnradkombination (25 zu 85 Zähne) noch untersetzt und in der Drehrichtung umgekehrt ist (effektiv $14,7 \mu\text{m}/\text{Umdr.}$). Die Verstellung wird vorerst von Hand durchgeführt, kann aber bei Bedarf durch einen Schrittmotor ersetzt werden. Der Verschiebetisch und die Mikrometerschraube wurden vor dem Einbau vollständig zerlegt, mit Aceton entfettet und mit Tieftemperaturschmiermittel (Molybdändisulfid) gleitfähig gemacht.

Tabelle 4.2: Tabelle wärmespezifischer Parameter für verschiedene Materialien [139].

	Längenausdehnungs- koeffizient (0-100°C) [$10^{-6}/\text{K}$]	Wärmeleit- fähigkeit (20°C) [$\text{W}/(\text{m}\cdot\text{K})$]	Spez. Wärme- kapazität (20°C) [$\text{kJ}/(\text{kg}\cdot\text{K})$]
Aluminium	24	220	0,90
Messing	18	111	0,39
Stahl (V2A)	16	15	0,50
Glas (Flint)	7,9	0,78	0.48
Glas (Kron)	9,5	1,07	0,67
Glas (Quarz)	0,45	1,36	0,73

Beim Zusammenbau ist besonders darauf zu achten, dass die seitliche Beweglichkeit des Schlittens minimal ist. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die Probe bei Verstellung der z-Position auch in x/y-Richtung versetzt wird. Obwohl die laterale Verschiebung bei einer schrittweisen Veränderung der z-Position um $5 \mu\text{m}$ kleiner als $0,2 \mu\text{m}$ ist, ist es kaum möglich, einen z-Scan eines einzelnen Moleküls durch Drehen an der Feinverstellung aufzunehmen. Die laterale Drift des Scanners ist in ähnlicher Größenordnung beobachtet worden. Innerhalb der Aufnahme von 5 Bildern oder einer Zeit von ca. 1 h ist die Drift des Laserspots in der Probenebene kleiner als $0,2 \mu\text{m}$. Störungen durch Verkipfung des gesamten Probenstabes treten nicht auf, weil er durch einen Federring über der Probe festgeklemmt ist. In Abb. 4.12 ist der Aufbau zur Probenhalterung dargestellt.

Die Materialien wurden aufgrund ihrer Wärmeeigenschaften und Bearbeitbarkeit ausgewählt. Für alle Stäbe, die vom Inneren des Kryostaten nach außen führen, wurde V2A-Stahl wegen der geringen Wärmeleitfähigkeit verwendet. Alle massiven Teile zur Objektiv- und Probenbefestigung wurden in Messing mit geringer spezifischer Wärmekapazität angefertigt. In temperaturabhängigen Experimenten führt die Längenausdehnung der Stoffe zur Dejustierung. Die Gesamtausdehnung des Stabs ist dabei ohne große Bedeutung. Entscheidend ist aber der relative Abstand von der Probe zum Objektiv. Durch eine Kombination von Aluminium und Messing wurde versucht, diesen Effekt aufzuheben. In der Praxis ist dies nicht ganz gelungen, unter Umständen deshalb, weil die angenommenen Werte (siehe Tabelle 4.2) nicht für tiefe Temperaturen gelten.

Das Auflösungsvermögen, das mit dem verwendeten Mikroskopobjektiv theoretisch erreicht werden soll, ist $\Delta x_{hb} = 0,4 \mu\text{m}$ und $\Delta z_{hb} = 0,7 \mu\text{m}$ (im roten Spektralbe-

reich). Die praktisch erreichten Werte von $\sim 0,7\mu\text{m}$ für Δx_{hb} und $\sim 3\mu\text{m}$ für Δz_{hb} liegen klar über den theoretischen Grenzen. Sie können mit zu geringer Ausleuchtung des Objektivs, der Verwendung zu großer Pinholes und vor allem Abbildungsfehlern wie sphärischer Aberration und Astigmatismus erklärt werden. Im Strahlengang von Objektiv zur Probe spielen die verschiedenen auftretenden Brechungsindizes eine Rolle, weil sie zur Defokussierung führen. Die Probe befindet sich meist zwischen zwei Objektträgern, so dass beim Eintritt in den ersten Objektträger eine erste Brechung und beim Übertritt in die Probe eine weitere Brechung auftritt.

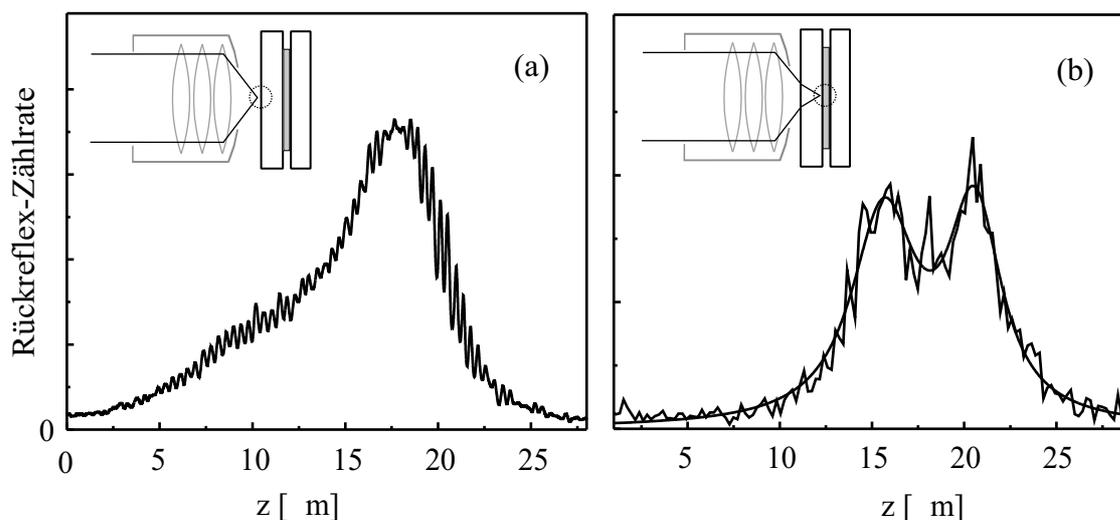


Abbildung 4.13: Abhängigkeit der Rückreflex-Zählrate bei Verschiebung der Probe in z -Richtung. (a) Fokus im Bereich der ersten Grenzfläche des Objektträgers. (b) Fokus im Bereich der Probe, die eine Glycerin-Wasser-Lösung ist.

Daneben müssen aber noch weitere Abbildungsfehler durch das Objektiv auftreten, denn das Rückreflex-Signal vom ersten Übergang in den Objektträger hat bei koaxialem Strahlengang bezüglich z -Veränderung eine asymmetrische Gestalt (siehe Abb. 4.13 a). Auch die direkte Beobachtung der Rückreflexe nach dem dichroitischen Strahlteiler ist abhängig von der genauen Lage des Fokussierungspunkts: Liegt der Fokus noch außerhalb des Objektträgers, so sieht man einen unscharfen Spot; ist der Fokus schon im Glas, so zeigt sich ein Ringmuster mit hellem Mittelpunkt und intensiven Ringen (im Gegensatz zum Airy-Muster). Der Grund liegt möglicherweise darin, dass das Objektiv entgegen der Aussagen des Herstellers deckglaskorrigiert ist. Die in Abb. 4.13 auftretenden Zacken entstehen beim ruckartigen Verdrehen der z -Feinverstellung in winzigen Schritten.

Detektiert man die Zählrate des Rückreflexes, während der Fokus vom einem Deckglas durch die Probe ins zweite Deckglas verfahren wird, so erhält man einen symmetrischen Graphen mit zwei lorentzähnlichen Peaks der Halbwertsbreite $\sim 3\mu\text{m}$

Tabelle 4.3: Tabelle der Brechungsindizes n für verschiedene Materialien [139].

	Brechzahl n		Brechzahl n
Flintglas F3	1,61	Glyzerin	1,46
Kronglas BK7 / Immersionsöl	1,52	Polyethylen	1,51
Quarzglas	1,46	Wasser	1,33

(siehe Abb. 4.13 b). Die Probe ist eine Glyzerin-Wasser-Mischung (60:40), so dass für beide Übergänge eine Brechungsindexänderung auftritt. Aus dem Peakabstand kann die Dicke der Probe zu $5 \mu\text{m}$ bestimmt werden (dabei wurde das Auftreten eines kleinen Zwischenmaxima beobachtet, das aber bisher nicht erklärt werden konnte). Bei wiederholten Messungen, auch in die entgegengesetzte Richtung, konnten die Strukturen reproduziert werden. Die Hysterese der Schraube zur z -Feinverstellung betrug dabei $1 \pm 0,5 \mu\text{m}$.

Das Ziel weiterer Experimente zur Charakterisierung und Optimierung der Apparatur war nicht die Verbesserung der Auflösung, sondern das Erreichen maximaler Detektionseffizienz. Mit besserer Auflösung stößt man ohnehin bald an die Grenzen der Genauigkeit von Scanner und z -Verstellung. Ist die Probe nicht auf der dem Objektiv zugewandten Seite, so führt die Brechung am Deckglas zwischen Probe und Objektiv zu einem effektiv kleineren Einsammelwinkel. Der Strahlengang ist in Abb. 4.14 qualitativ dargestellt. Für den Anregungsstrahlengang ist die Bre-

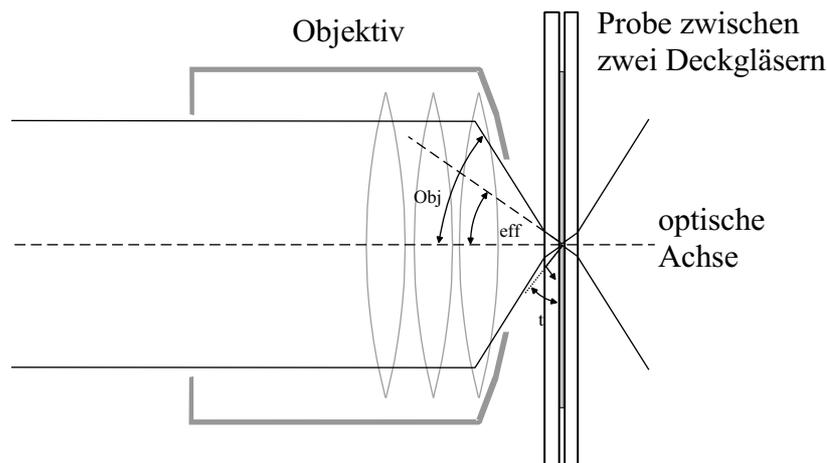


Abbildung 4.14: Strahlengang für Anregungs- und Fluoreszenzlicht bei Transmission durch ein Deckglas.

chung beim Eintritt in das Deckglas ohne größere Bedeutung, wenn man von den notwendigen Objektivkorrekturen absieht. Die numerische Apertur bleibt nach dem Brechungsgesetz erhalten, so dass kein Einfluss auf die Auflösung zu erwarten ist. Ist das Deckglas allerdings bei der Objektivkorrektur nicht berücksichtigt, führt die unterschiedliche Fokusverschiebung der Brechung für unterschiedliche Winkel zu Abbildungsfehlern (sphärische Aberration), die die optische Qualität des Mikroskops stark beeinträchtigen können. Eine größere Bedeutung hat diese Brechung aber für die Einsammeleffizienz. Auf dem Rückweg wird das Fluoreszenzlicht beim Übergang vom Glas in das optische dünnere Medium Luft noch weiter von der optischen Achse weggebrochen. Damit wird nur noch Licht bis zu einem Maximalwinkel von $\alpha_{eff} = 34^\circ$ eingesammelt, statt Licht bis zu einem Winkel von $\alpha_{Obj} = 58^\circ$, was einer NA von 0,85 entsprechen würde. Ab einem Winkel von $\alpha_t = 41^\circ$ würde ohnehin Totalreflexion des Fluoreszenzlichts auftreten. Der effektive Aufsammelanteil sinkt damit von 28 % ($\alpha_{max} = 58^\circ$) auf 12 % ($\alpha_{max} = 34^\circ$) des gesamten Fluoreszenzlichts.

4.4.4 Detektion

Der Detektionsstrahlengang ist im Bereich des Objektivs, des telezentrischen Systems und bis zum dichroitischen Spiegel identisch mit dem Anregungsstrahlengang. Die örtliche Veränderung des Strahlengangs durch die Scannerspiegel wird auf dem Rückweg kompensiert, so dass das Fluoreszenzlicht nach Reflexion an den Scannerspiegeln örtlich stabil ist. Die Trennung vom Anregungslicht gelingt mit dem dichroitischen Strahlteiler (*Omega*, XF41 mit Kante bei 595 nm, XF78 mit Kante bei 475 nm). Dieser wird so ausgewählt, dass die Wellenlänge des Anregungslichts kurzwelliger ist als die charakteristische Wellenlänge des Strahlteilers, ab der das Licht verstärkt transmittiert wird. Die Reflexion von kurzwelligem Licht ist stark polarisationsabhängig und schwankt zwischen 85 und 99 %. Die Transmission von langwelligem Licht liegt zwischen 90 und 97 %. Das Anregungslicht wird jedoch am dichroitischen Strahlteiler nur unzureichend abgeschwächt und muss mit einem Langpass- (*Schott*), Bandpass- (*AHF Analysetechnik*) oder Notchfilter (*Kaiser*) stärker unterdrückt werden. Notchfilter sperren nur eine diskrete Laserlinie und sind deshalb beim Verstimmen des Farbstofflasers ungeeignet. Die Bandpassfilter haben sich besonders im blauen Spektralbereich bewährt, weil sie auch längerwelligen Untergrund filtern. Sie haben außerhalb ihres Transmissionsbereichs, der bis zu 60 nm breit sein kann, optische Dichten von über 6.

Interessiert man sich zunächst für die gesamte Signalintensität, so wird das Fluoreszenzlicht mit einer plankonvexen Tubuslinse auf das konfokale Detektionsspinhole fokussiert. Die Brennweite der Linse wurde aus Platzgründen (abweichend von der sich

aus den Objektivdaten ergebenden Brennweite von 175 mm) zu 120 mm gewählt. Um möglichst wenig Signal am Pinhole zu verlieren, wurde der Durchmesser mit 200 μm sehr groß gewählt, und nur im Fall von dicken oder stark streuenden Proben auf 100 μm reduziert. Das am Pinhole transmittierte Licht wurde mit einer bikonvexen Linse ($f=75$ mm) auf die aktive Fläche einer Avalanche Photodiode (APD, EG&G SPCM-AQ 141) abgebildet. Einzelne Photonen reichen dabei aus, um an einem Halbleiterübergang eine Ladungslawine auszulösen, die von einer externen Elektronik detektiert werden kann. Die Pulse haben eine Spannung von 2 V (50Ω) und eine Länge von 9 ns. Die Totzeit zwischen den Pulsen ist 30 ns. Die Detektionseffizienz ist zwischen 460 und 940 nm über 30 % und hat ihr Maximum von 70 % bei 700 nm. Die APD hat eine Dunkelzählrate unter 100 Counts/s und eine Zerstörschwelle über eine Million Counts/s. Durch ihre aktive Fläche mit einem Durchmesser von 180 μm kann sie direkt in der Pinholeebene eingesetzt werden, wobei die Justierung dann schwerer durchzuführen ist. Pinhole und Linse sind lateral und axial fein verstellbar (300 μm /Umdrehung). Die Pulse werden mit einem Counter (*Stanford Research*, SR400, Diskriminator Level +300 mV für APD) gezählt und die Zählrate über den Analogausgang an den Analogeingang einer Multifunktionskarte (*National Instruments* AT MIO 16 XE-10) im Rechner weitergegeben. Zur Messung der Autokorrelationsfunktion können die Pulse der APD direkt in die Korrelatorkarte (*ALV* 5000) eingespeist werden.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wird ein Teil des Fluoreszenzlichts nach den Filtern mit einem Strahlteiler umgelenkt und, wie schon in Abschnitt 4.3 beschrieben, in einem Spektrographen dispergiert und mit einer CCD Kamera detektiert. Durch die räumliche Filterung am Eintrittsspalt des Spektrographen in der einen Dimension und das Auswählen nur bestimmter Zeilen der CCD Kamera in der anderen Dimension ist auch diese Abbildung konfokal.

Zur Abschätzung der Detektionseffizienz der gesamten Apparatur wurden die Transmissionskoeffizienten und Reflexionskoeffizienten sämtlicher Elemente des Strahlengangs gemessen. Diese sind stark abhängig von den jeweiligen experimentellen Bedingungen. Es zählen dazu vor allem die Wellenlängen- und Polarisationsabhängigkeit vieler optischer Elemente, insbesondere der dichroitischen Strahlteiler und Filter. Bei der Auswahl der optischen Elemente wurde auf Antireflex-Beschichtungen für Linsen und Spiegelbeschichtungen mit hohen Reflexionskoeffizienten geachtet und beim Einsatz von Filtern wurde die Wirkung auf das Fluoreszenzlicht einbezogen. In Tabelle 4.4 ist der typische Anteil an transmittiertem oder reflektiertem Licht für alle Elemente im Detektionsstrahlengang angegeben. Die sich daraus ergebende Detektionseffizienz liegt bei 1 %.

Analog zu den Verlusten im Detektionsstrahlengang muss die Anregungsleistung,

Tabelle 4.4: Tabelle des transmittierten oder reflektierten Anteils des Fluoreszenzlichts für alle optischen Elemente im Detektionsstrahlengang.

	Anteil
Einsammelraumwinkel	0,12
Objektiv	0,7
Spiegel	0,92
Kryostatenfenster	0,7
Telezentrisches System	0,94
Scannerspiegel	0,96
Dichroitischer Strahlteiler	~ 0,7
Filter	~ 0,8
Tubuslinse	0,97
Pinhole	0,7
Linse	0,97
Avalanche Photodiode	0,6
Detektionseffizienz	0,01

die immer vor dem dichroitischen Strahlteiler gemessen wurde, mit allen Abschwächungskoeffizienten verrechnet werden, um die tatsächliche Leistung auf der Probe zu erhalten. Unter Einbeziehung der Spotgröße kann damit auch die tatsächliche Intensität auf der Probe bestimmt werden. Zur Kontrolle der Rechnungen und auch der Justierung wurde jeweils die Zählrate des Rückreflexes von der ersten Grenzfläche der Objektträger detektiert. Zur Abschwächung wurde ein Graufilter mit OD3 nach dem dichroitischen Strahlteiler eingesetzt. Am Beispiel von $10 \mu\text{W}$ Anregungslicht der Wellenlänge 585 nm vor dem dichroitischen Strahlteiler DC595 kann man die effektive Leistung auf der Probe zu $3 \mu\text{W}$ abschätzen, was einer Photonenzahl von 10^{13} pro Sekunde entspricht. Nimmt man an, dass 4 % der Photonen reflektiert werden und beachtet man die Transmission des dichroitischen Strahlteilers (bei der gewählten Polarisation und Wellenlänge nur 0,3 %, bei gedrehter Polarisation 6,6 %) und des Graufilters (0,1 %), so lässt sich eine Zählrate von 200 000 C/s erwarten. Die experimentelle Zählrate lag mit 135 000 C/s etwas darunter, in einer für die Abschätzung akzeptablen Größenordnung.

4.4.5 Steuerung und Datenverarbeitung

Die Steuerung der Scannerspiegel und Erfassung der Messdaten wird mit einem Programm durchgeführt, das in der graphischen Programmiersprache G unter *LabVIEWTM* (*National Instruments*) geschrieben wurde [140]. Die Schnittstelle zur Kommunikation mit anderen Geräten ist eine Multifunktions-Computersteckkarte (*National Instruments AT MIO 16 XE-10*), von der im Wesentlichen die Analogein- und -ausgänge genutzt werden.

Zur Positionierung der Galvanometerspiegel kann an zwei Analogausgängen eine Spannung zwischen -10 V und +10 V angelegt werden. Da nur sehr kleine Spiegelauslenkungen nötig sind, werden die effektiv am Scanner anliegenden Spannungen mit einem Spannungsteiler ($100 \Omega : 2,49 \text{ k}\Omega$) auf etwa $\frac{1}{25}$ reduziert. Bei einem Spannungsunterschied von $\Delta U = 20 \text{ V}$ wurde dann ein optischer Winkel von 75,5 mrad beobachtet, woraus sich unter Beachtung der Winkeländerung durch das telezentrische System und mit der Objektivbrennweite eine Ortsänderung von $130 \mu\text{m}$ in der Probenebene berechnen lässt.

Der Programmablauf zur Aufnahme von Fluoreszenzbildern beginnt mit der Eingabe der Start- und Endspannung ($-10 \text{ V} < U < +10 \text{ V}$) für die x- und y-Richtung, womit der Bildausschnitt gewählt wird (durch die Wahl quadratischer Bilder ist die Endspannung für y durch die anderen Parameter bereits festgelegt). Außerdem kann die Auflösung in Form der Pixelanzahl und die Integrationszeit pro Pixel ($> 1 \text{ ms}$) gewählt werden. Nach der Betätigung des Startbutton beginnt die Scannerpositionierung und Datenaufnahme. Startspannungen und Spannungsschritte ergeben sich aus den eingegebenen Daten. Zunächst wird die Spannung zur Steuerung der y-Ablenkung unverändert gelassen und die der x-Ablenkung stufenweise verändert. Bei jedem Schritt wird die Zählrate des Counters, dessen Integrationszeit gerade die eines Scanschrittes ist, über einen Analogeingang eingelesen und dem aktuellen (x,y) Paar zugeordnet. Nach dem Scan der ersten Zeile und auch nach jeder weiteren Zeile wird der Bildausschnitt des detektierten Bereichs am Monitor dargestellt, die x-Spannung auf den Startwert zurückgesetzt und die y-Spannung um einen Spannungsschritt erhöht. Nach einer kurzen Wartezeit (50 ms) beginnt der Scan der nächsten Zeile. Durch den geschlossenen Regelkreis des Scanners sind nicht-lineare Bewegungen vernachlässigbar. Für schnellere Scans besteht prinzipiell die Möglichkeit, die Spannung nicht stufenförmig zu verändern, sondern die Spiegel mit einer Rampenspannung kontinuierlich zu drehen. Diese Technik erfordert aufwendige Hard- und Software zur kontrollierten Beschleunigung und Abbremsung der Spiegel und wird in kommerziellen Geräten eingesetzt. Für die hier durchgeführten Experimente waren Integrationszeiten von 10 ms und länger nötig und damit die

erste Methode die geeignetere. Am Ende werden die Daten im ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) Format abgespeichert, wobei die Dateinamen für die einzelnen Bilder durchnummeriert werden. Zum Vergleich wird das vorherige Bild immer in einer zweiten Graphik dargestellt.

Nach der Aufnahme eines Fluoreszenzbildes kann jeder beliebige Ort mit Hilfe seiner Koordinaten (x,y) angesteuert werden. Danach kann die Zählrate an diesem Ort als Funktion der Zeit detektiert werden. Neben der Aufnahme von Zeitspuren eignet sich diese Funktion zur Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren. Die automatische Steuerung des Shutters ist vorgesehen, um die Probe nur bei der Datenaufnahme zu beleuchten und unnötiges Ausbleichen zu vermeiden. Das Zurücksetzen der Spiegelposition auf die Nullpunkt-Stellung ($U_x = U_y = 0$), in der die Justierung durchgeführt wird, ist mit einem eigenen Button möglich.

Die Bildanalyse wird mit *WinView*TM (*Princeton Instruments*) durchgeführt. Zur Konvertierung der ASCII Daten in das Dateiformat *.spe wurde von P. Zehetmayer ein Programm geschrieben [140]. Zur Datenanalyse und Darstellung wird *Origin*TM 5.0 (*Microcal*) verwendet.

4.5 Probensysteme und ihre Präparation

Die Strukturformeln der in den Experimenten verwendeten Farbstoffe und Matrizen sind in Abb. 4.15 dargestellt. In diesem Abschnitt soll nur auf die Probenpräparation eingegangen werden. Fluoreszenzeigenschaften und Spektren werden erst in den folgenden Kapiteln diskutiert.

In den spektral hochauflösenden Experimenten zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde das aromatische Farbstoffmolekül Terrylendiimid (TDI) in den Matrizen Hexadecan (HD) und Polyethylen (PE, Kristallinität < 25 %) untersucht. TDI ist ein Derivat des in der Einzelmolekülspektroskopie vielfach verwendeten Terrylen und wurde im Arbeitskreis von Prof. K. Müllen (Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz) synthetisiert [141]. In diesem Arbeitskreis wurden auch das gekoppelte System Perylen-Terrylendiimid [142] und andere Derivate von Perylen und Terrylen hergestellt. Zur Herstellung der Hexadecan-Probe wird eine geringe Menge des Farbstoffs in Methylenchlorid CH_2Cl_2 gelöst, eine entsprechende Menge Hexadecan zugegeben, so dass nach Abzug des Methylenchlorids eine 10^{-9} molare Lösung zur Verfügung steht. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich das Methylenchlorid nicht ganz entfernen lässt, und deshalb TDI auch direkt in Hexadecan gelöst wurde, was im Ultraschallbad in sehr geringen, aber ausreichenden Mengen möglich ist. Die Messungen wurden mit dem Faseraufbau durchgeführt. Das Faserende wurde einfach

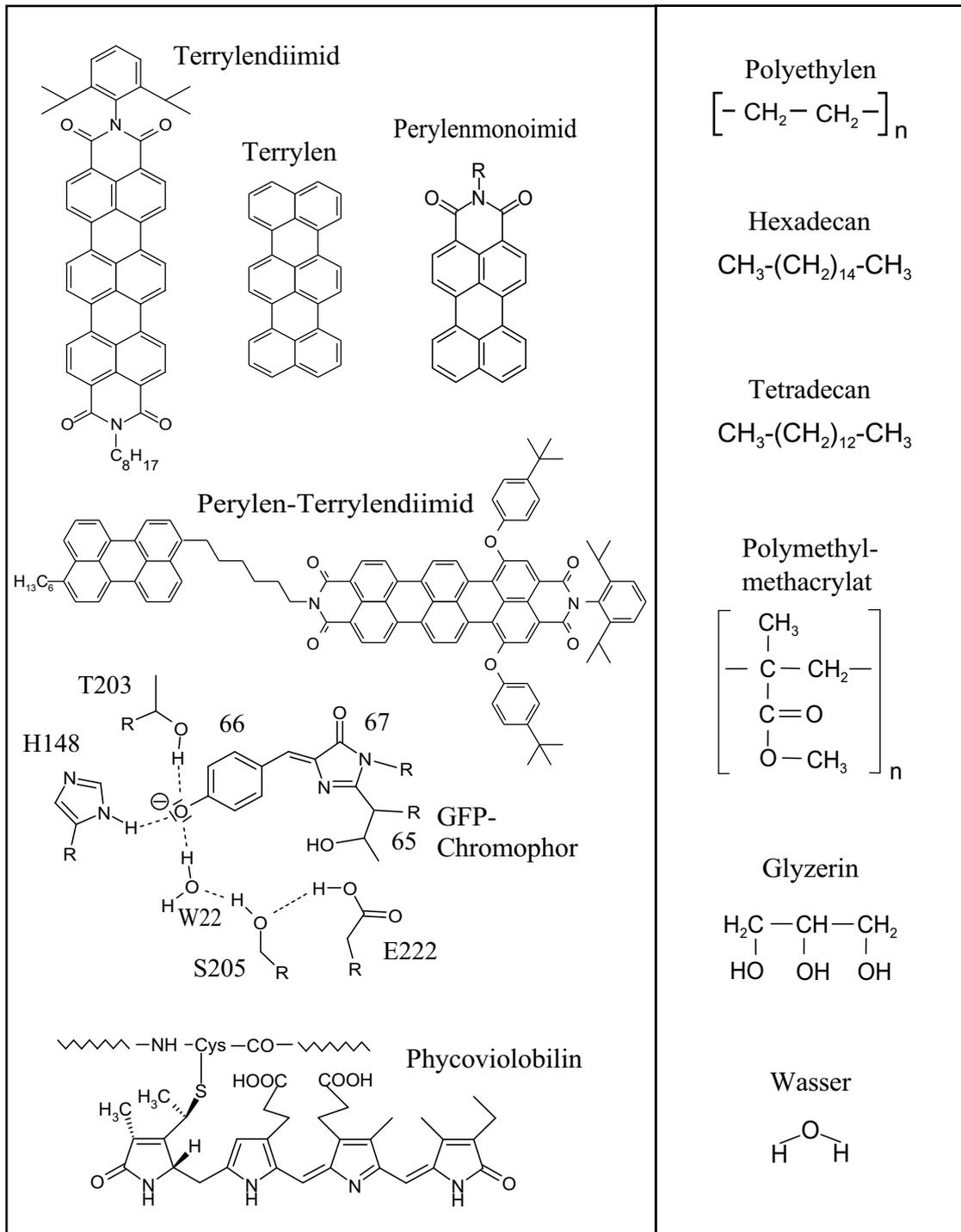


Abbildung 4.15: Strukturformeln der verwendeten Farbstoffmoleküle (links) und Matrizen (rechts).

durch Eintauchen der Faserspitze in die Lösung benetzt und im Kryostaten schnell abgekühlt. Versuche, eine ähnliche Probenpräparation mit Nonan durchzuführen, scheiterten, weil es zu schnell verdampfte.

Zur Herstellung von PE-Proben wird zunächst ebenfalls eine Lösung des Farbstoffes in Methylenchlorid CH_2Cl_2 oder Cyclohexan C_6H_{12} hergestellt, die Konzentration über ein Absorptionsspektrum ermittelt und pro 10^{-9} mol Farbstoff in Lösung ein Gramm Polyethylen-Pulver zugegeben und suspendiert. Das Lösungsmittel wird an einer Hochvakuumapparatur abgezogen oder mit einem Fön verdampft. Man erhält ein Polymerpulver, auf dem der Farbstoff in geringer Menge adsorbiert ist. Der Film wird hergestellt, indem ein kleines Pulverkörnchen auf einem Glasplättchen (Objektträger) auf 170°C erhitzt wird. Ist die Probe völlig geschmolzen, wird sie mit einer zweiten Glasplatte bedeckt, gepresst ($d \approx 10 \mu\text{m}$) und in flüssigem Stickstoff abgeschreckt. Dadurch wird das PE weitgehend im amorphen Zustand eingefroren und löst sich zudem besser vom Glas. Aus dem Film lässt sich ein winziges Stückchen guter optischer Qualität ausschneiden und an die Faser kleben oder auf einem Deckgläschen für den Linsenaufbau oder das Mikroskop präparieren.

Die Herstellung sehr dünner Filme für die Mikroskopie gelingt durch *Spin Coating* mit der Matrix Polymethylmethacrylat (PMMA). Dazu wird der Farbstoff zunächst in Chloroform CHCl_3 gelöst und eine etwa 10^{-9} molare Lösung mit einer 5 %igen PMMA-Chloroform-Lösung zu gleichen Teilen vermischt. Die entstandene Lösung wird weiter mit Chloroform verdünnt (1:20), gefiltert und durch *Spin Coating* (mit 3000 U/min) ein dünner Film ($d \approx 20 \text{ nm}$) des Farbstoffs in PMMA auf einem Objektträger aufgebracht.

Bei der Untersuchung von Farbstoffen, die in Käfigstrukturen eingebettet sind, tritt das Problem auf, dass die optische Qualität der Proben meist sehr schlecht ist. Zur Herstellung der Proben von Pentacen in Perhydrotriphenylen (PHTP, siehe Kapitel 6.4.2) wurden die Kristalle von P. Rechtsteiner (Arbeitskreis Prof. J. Hulliger, Departement für Chemie und Biochemie, Universität Bern) gleich zwischen zwei Objektträgern gezüchtet, die dann direkt im Experiment eingebaut werden konnten. Die Proben von Terrylen in den nanoporösen Strukturen der Klasse M41S aus dem Arbeitskreis von Prof. P. Behrens (Anorganische Chemie, Universität Hannover) waren weiße Pulver. Einzelne Körnchen davon wurden trocken zwischen zwei Objektträgern verteilt und festgeklemmt, da alle Versuche der Einbettung der Strukturen (z.B. in Dimethylsulfoxid DMSO) zur Brechungsindexanpassung keine deutliche Reduzierung des Untergrundsignals ergaben.

Für die biologischen Proben wurden Glycerin-Wasser (bzw. Puffer) Lösungen als Matrix verwendet, die auch in Lochbrennexperimenten standardmäßig eingesetzt

werden. Für die Experimente am Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) wurde Glycerin und Wasser im Verhältnis 3:1 gemischt und eine etwa 10^{-9} molare Lösung verwendet. Der Wild-Typ wurde von J. Wiehler (Arbeitskreis Dr. B. Steipe, Genzentrum München) zur Verfügung gestellt, EGFP (F64L/S65T) wurde von *Clontech* (Palo Alto, CA) bezogen. Phycoerythrocyanin (PEC, als Trimer mit 9 Chromophoren), sowie einzelne α -Untereinheiten (mit einem Chromophor, dem Phycoviolobilin) davon standen in einer 60 %igen Glycerin-Lösung von Dr. A. Parbel (Arbeitsgruppe Prof. H. Scheer, Biologisches Institut, Universität München) zur Verfügung. Etwa $1 \mu\text{l}$ der Lösungen wurde jeweils auf einen Objektträger getropft. Durch Aufsetzen eines zweiten Objektträgers wurde der Tropfen zu einer ca. $5 \mu\text{m}$ dünnen Schicht verteilt.

Kapitel 5

Spektral hochauflösende Untersuchungen

In diesem Kapitel werden die spektral hochauflösenden Untersuchungen dargestellt, die nur bei tiefen Temperaturen möglich sind und die die scharfen, gegenüber äußeren Einflüssen sehr empfindlichen Absorptionslinien nutzen. Die Experimente wurden zu Beginn dieser Dissertation an der vorhandenen Apparatur durchgeführt.

Der erste Teil handelt von den Experimenten an einem neuen Farbstoff, dem Terrylendiimid (TDI). Neben der Charakterisierung des Chromophors in Bulk-Experimenten gelang die Isolierung einzelner Moleküle in verschiedenen Matrizen. Durch die Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren ist die Beobachtung von Wechselwirkungen des Chromophors mit der umgebenden Matrix möglich. Einzelne TDI-Moleküle konnten dabei als hochempfindliche Sonden zur Charakterisierung der gewählten Wirtsmaterialien verwendet werden. Durch Messungen mit resonanter Anregung konnten außerdem die Populations- und Depopulationsraten des Triplettzustands elegant bestimmt werden.

Der zweite Teil dieses Kapitels handelt von Experimenten am kovalent verknüpften Farbstoffmolekül Perylen-TDI, das zur Untersuchung von strahlungslosem Energietransfer gezielt synthetisiert wurde. Die Untersuchung dieses in der Natur äußerst wichtigen Prozesses auf der Basis einzelner Moleküle im Festkörper hat den wesentlichen Vorteil, dass jegliche Mittelungen über Abstände und Konformationen vermieden werden und damit der Mechanismus bestmöglich charakterisiert werden kann. In diesem Teil wird auch ein kurzer Überblick über die Theorie des elektronischen Energietransfers nach dem Förster-Mechanismus gegeben.

5.1 Terrylendiimid - ein idealer Fluorophor bei 1,4 K und höheren Temperaturen

Terrylendiimid (TDI, siehe Abb. 4.15) ist ein Derivat des Terrylen, welches seit der ersten Verwendung innerhalb dieser Arbeit [72] in vielen Tieftemperatur-Einzelmolekülexperimenten verwendet wurde [143, 144]. Es wurde wie in der Literatur beschrieben synthetisiert [141]. Mit TDI wurde die Gruppe der für die spektral hochauflösende Einzelmolekülspektroskopie geeigneten Moleküle um einen wichtigen Farbstoff erweitert. Trotz der zur Synthese notwendigen Seitengruppen zeigt es bei tiefen Temperaturen in geeigneten Matrizen scharfe Nullphononenlinien und ist darum, sowie wegen seiner starken Absorption, hohen Fluoreszenzquantenausbeute und vernachlässigbaren Bevölkerung von Dunkelzuständen, ein hervorragend geeigneter Farbstoff für Tieftemperatur-Einzelmolekülexperimente. TDI zeigt aber neben den eben erwähnten Eigenschaften auch eine geringe Photobleichrate bei Raumtemperatur, was es zum idealen Fluorophor für Einzelmolekülexperimente im gesamten Temperaturbereich macht. Es eignet sich auch als Bezugssystem beim Vergleich der Eigenschaften verschiedener Farbstoffe.

In diesem Kapitel werden die Tieftemperaturexperimente behandelt, für die TDI in die Matrizen Polyethylen (PE) und Hexadecan (HD) eingelagert wurde. Die ersten mikroskopischen Untersuchungen von TDI wurden in der Matrix Polyvinylbutyral (PVB) in Zusammenarbeit mit Wolfgang Göhde (Arbeitskreis Prof. H. Fuchs, Physikalisches Institut der Universität Münster) zwischen 96 K und Raumtemperatur durchgeführt. In dieser Arbeit wird aber nur auf eigene Untersuchungen an TDI eingegangen. Die Experimente bei höheren Temperaturen, bei denen die Matrix Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet wurde, werden in Kap. 6.3 behandelt.

5.1.1 Spektrale Eigenschaften

TDI absorbiert im roten Spektralbereich und kann mit gängigen Laserquellen wie einem HeNe-Laser, einem Kr^+ Laser, einem DCM-Farbstofflaser oder auch einem billigen Diodenlaser angeregt werden. Am Absorptionsmaximum, das in Abhängigkeit vom Lösungsmittel um 650 nm variiert, hat es einen Extinktionskoeffizienten ϵ von etwa 90 000 l/(mol cm). Das Absorptionsspektrum von TDI in einer Hexadecan-Lösung bei Raumtemperatur ist bereits in Abb. 2.8 dargestellt.

Das Fluoreszenzanregungsspektrum von TDI in PE bei 1,4 K unterscheidet sich vom Absorptionsspektrum in Lösung bei Raumtemperatur nicht, wenn man von einem leichten *Solvent Shift* absieht. Die polymere Matrix ist zwar nicht völlig amorph, son-

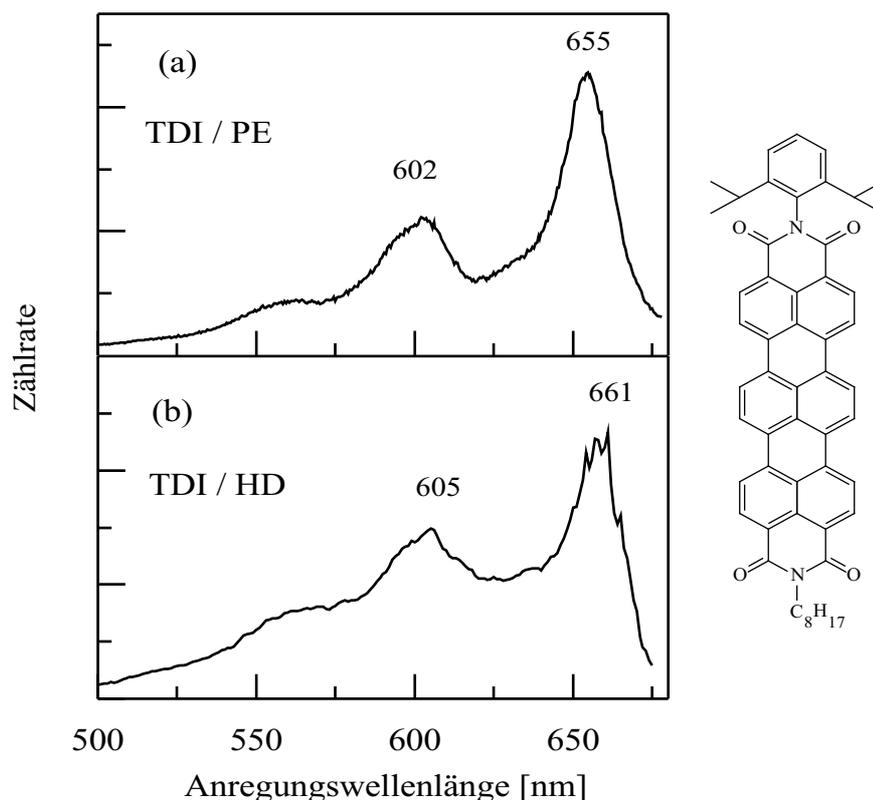


Abbildung 5.1: Fluoreszenzanregungsspektren einer höher konzentrierten Probe von TDI in (a) Polyethylen und (b) Hexadecan bei 1,4 K. Das Spektrum (b) zeigt eine breite inhomogene Verteilung ähnlich wie TDI / PE oder TDI in Lösung bei Raumtemperatur und nur schwache Shpolskii-Sites um 661 nm. Die inhomogene Breite des 0-0 Übergangs ist in HD nur etwa 10 % schmaler als in PE. Zusätzlich ist die Strukturformel von TDI abgebildet.

dern semikristallin (Kristallinitätsgrad $< 50\%$), die damit verbundene Unordnung und Variation der Molekülumgebungen ist jedoch ausreichend für eine inhomogene Verbreiterung über fast 20 nm. Als weitere Matrix bietet sich Hexadecan an, dessen chemischer Aufbau mit PE identisch ist, wenn man von der Kettenlänge absieht. Außerdem sind derartige Alkane für den Shpolskii-Effekt [145] bekannt. Verwendet man sie als Matrix für geeignete Moleküle, zeigen sich im Fluoreszenzanregungsspektrum bei flüssig-Helium-Temperaturen nach raschem Abkühlen wenige scharfe Peaks, die als Shpolskii-Sites bezeichnet werden. Diese gehören zu bevorzugten substitutionellen Einbaulagen der Farbstoffmoleküle in die schichtartig eingefrorene, polykristalline Wirtsmatrix. Auf diese Weise sollte versucht werden, auch für TDI eine stabile Umgebung zu finden. Im Spektrum (Abb. 5.1 b) deutet sich der Shpolskii-Effekt jedoch nur schwach durch einige kleine Peaks an und auch die gesamte inhomogene Breite ist gegenüber der PE-Matrix nur um etwa 10 % reduziert, was aufgrund der

sperrigen Seitengruppen auch zu erwarten ist. In den Einzelmolekülexperimenten zeigt sich aber, dass im Gegensatz zur Matrix PE in HD einige Moleküle in eine kristalline Umgebung eingebaut sind, die so starr und unbeweglich ist, dass trotz hoher Anregungsleistungen keine (lichtinduzierten) spektralen Sprünge auftreten.

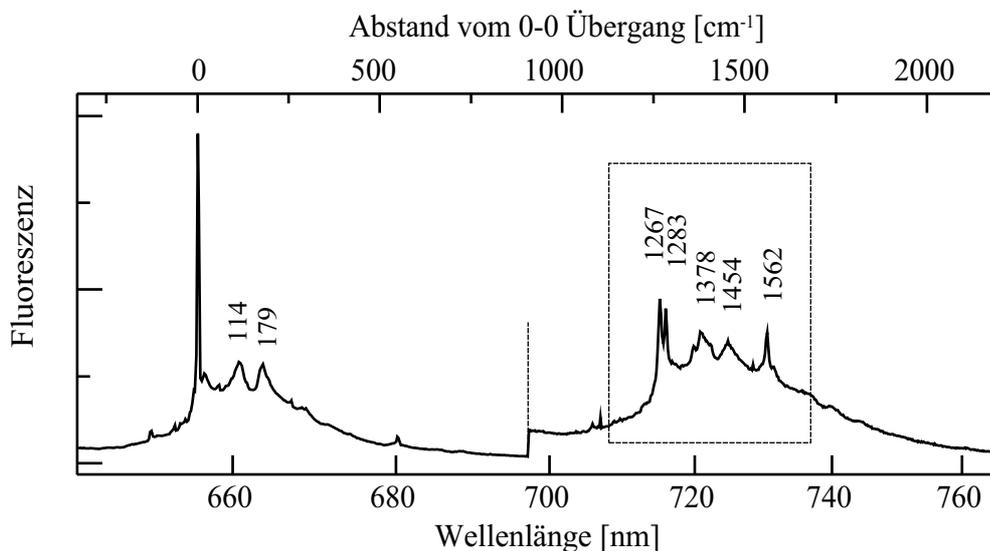


Abbildung 5.2: Fluoreszenzspektrum mit Linienverschmälderung (FLN) einer hoch konzentrierten Probe von TDI in PE bei 1,4 K, angeregt bei 633 nm. Vom eingerahmten Bereich existieren Einzelmolekülspektren in Abb. 5.11.

Bevor die Einzelmolekülexperimente behandelt werden, soll noch auf die Fluoreszenzeigenschaften von TDI eingegangen werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute liegt nach [141] bei 90 (± 10) %. Das linienverschmälerte Fluoreszenzspektrum von TDI in PE bei 1,4 K ist in Abb. 5.2 dargestellt. Ein großer Teil der Fluoreszenz ist um den 0-0 Übergang konzentriert und nur ein geringer Anteil geht in vibronische Niveaus über. Die auftretenden Schwingungsfrequenzen sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Vergleicht man die Emissionsspektren von TDI und unsubstituiertem Terrylen [146, 147], so zeigt sich eine ziemlich gute Übereinstimmung für die starken vibronischen Banden im Fingerprint-Bereich (TDI: 1267 cm^{-1} , 1284 cm^{-1} , 1562 cm^{-1} ; Terrylen: 1272 cm^{-1} , 1283 cm^{-1} , 1562 cm^{-1}). Mit quantenchemischen Rechnungen für Terrylen konnten diese Normalschwingungen den C-C Streckerschwingungen zugeordnet werden, die offensichtlich kaum von den Substituenten von TDI beeinflusst werden. Auch die schwächeren Banden bei 547, 1360 und 1378 cm^{-1} erscheinen im Spektrum von Terrylen bei ähnlichen Frequenzen. Die Mode mit 179 cm^{-1} entspricht der intensiven Bande von Terrylen bei 243 cm^{-1} . Diese ist einer Streckung des gesamten Moleküls in Richtung der langen Achse zugeordnet, was im Fall des TDI zu einer geringeren Schwingungsfrequenz durch der größere schwingende Masse führt.

Tabelle 5.1: Schwingungsfrequenzen in cm^{-1} von TDI in PE bei 1,4 K (Auflösung ca. 5 cm^{-1} , starke Banden sind mit (s) gekennzeichnet).

Frequenz	Frequenz	Frequenz
19	547 (s)	1378
59	1082	1405
114 (s)	1104	1454
179 (s)	1267 (s)	1523
257	1283 (s)	1562 (s)
297	1360	

Die Abschätzung des Effektes über die Formel $\omega = \sqrt{k/m_r}$ (Schwingungsfrequenz ω , Kraftkonstante k , reduzierte Masse m_r) und die unterschiedlichen Massen von Te und TDI zeigt eine gute Übereinstimmung mit den beobachteten Frequenzen.

5.1.2 Fluoreszenzanregungsspektren einzelner TDI-Moleküle

Die Einzelmolekülexperimente hatten zunächst das Ziel, molekülinterne Effekte und Parameter wie das Sättigungsverhalten und die Triplettraten zu untersuchen. Dazu musste lediglich eine geeignete Matrix gefunden werden, die zu ausreichend frequenzstabilen Absorptionslinien führt. In weiteren Untersuchungen sollte TDI als Sondenmolekül zur Charakterisierung verschiedener Wirtsmatrizen eingesetzt werden, um deren Unterschiede näher zu charakterisieren. In Linienbreitenverteilungen und temperaturabhängigen Linienverbreiterungen und -verschiebungen spiegelt sich der Grad der Unordnung in den gewählten Matrizen wider und lässt sich quantitativ angeben.

Fluoreszenzanregungsspektren einzelner TDI-Moleküle konnten ohne große Probleme sowohl in PE als auch in HD im Wellenlängenbereich von 651 bis 668 nm beobachtet werden. Sie wurden mit dem Faseraufbau unter Verwendung eines Langpassfilters RG715 detektiert. In Abb. 5.3 sind Anregungsspektren einzelner TDI-Moleküle in (a) PE und (b) HD dargestellt. In der Polymermatrix zeigten die meisten Anregungslinien spontane bzw. lichtinduzierte Frequenzsprünge, auch dann, wenn der Laser mit geringer Leistung verstimmt wurde. In der polykristallinen HD Matrix war die spektrale Stabilität deutlich höher. Die Moleküle scheinen insgesamt stabilere Umgebungen zu haben, obwohl im Fluoreszenzanregungsspektrum die inhomogene Verbreiterung fast genauso groß erscheint wie in PE. Messungen mit hohen

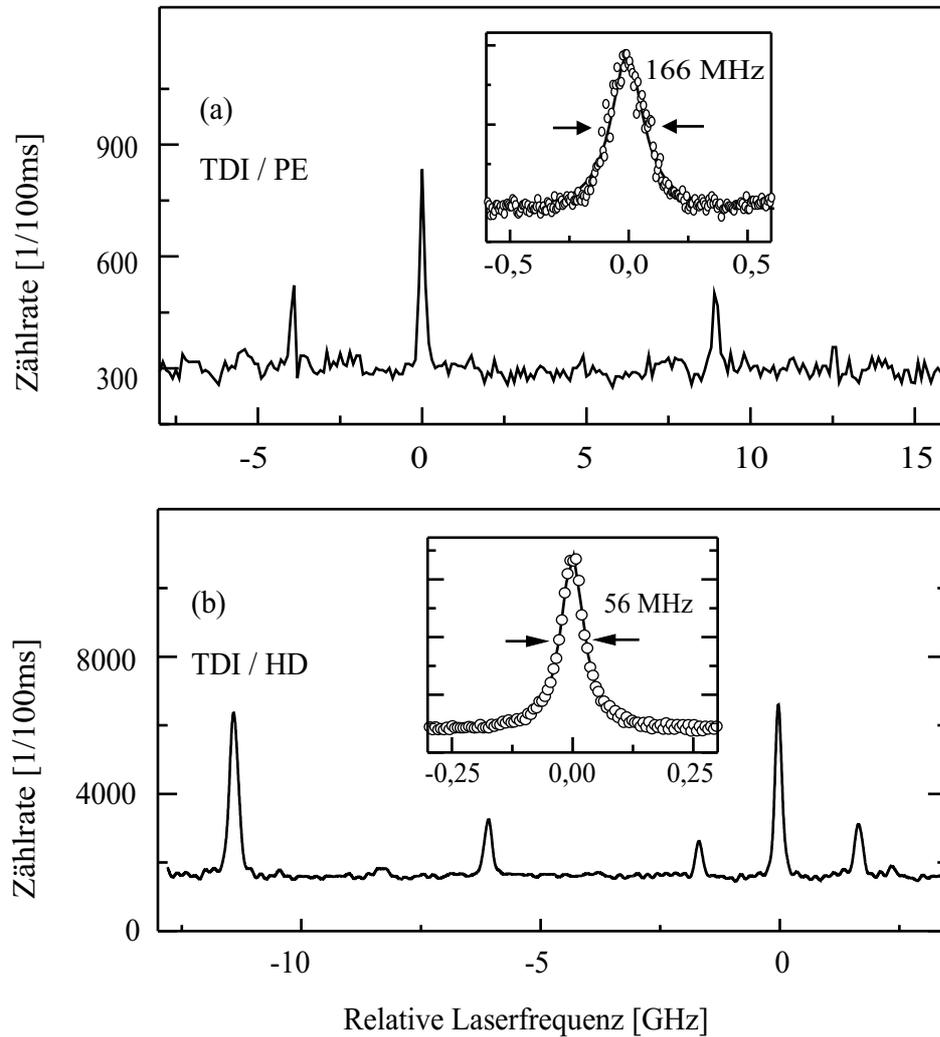


Abbildung 5.3: Fluoreszenzanregungsspektren einzelner TDI-Moleküle in (a) PE und (b) HD bei 1,4 K. Eines der Moleküle ist jeweils in einer Unterabbildung mit größerer Auflösung dargestellt, zusammen mit einem Lorentzfit und der daraus resultierenden Linienbreite $\Delta\nu_{hb}$. Die Linien von TDI in HD sind im Mittel deutlich schmäler und intensiver. Parameter: (a) $I = 25 \text{ mW/cm}^2$, $0 \text{ GHz} \equiv 653,06 \text{ nm}$; (b) $I = 80 \text{ mW/cm}^2$, $0 \text{ GHz} \equiv 659,02 \text{ nm}$

Anregungsintensitäten konnten deshalb nur in der HD-Matrix durchgeführt werden. Dazu zählen Sättigungsuntersuchungen, die intensitätsabhängige Messung der Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität zur Bestimmung der Triplett-raten und auch die Detektion von Fluoreszenzspektren einzelner Moleküle.

Alle Linienformen konnten durch eine Lorentzform angepasst werden (siehe Unterabbildungen in Abb. 5.3). Ausnahmen waren nur Linien, bei denen das Signal plötzlich abbrach und in einigen Fällen spontan wieder zurückkehrte oder an einer anderen Frequenzposition im folgenden Spektrum auftauchte. Die Ursachen dieser

Störungen sind spektrale Sprünge, die in vielen Fällen das Experiment an dem individuellen Molekül beenden. Die Halbwertsbreiten der schmalsten Moleküle lagen um 45 MHz für niedrige Anregungsintensitäten (25 mW/cm^2). Wenn dies dem lebensdauerlimitierten Wert entspricht, hat der angeregte Zustand eine Lebensdauer von 3,5 ns, ähnlich dem in Chloroform-Lösung gemessenen Wert von 3,3 ns [149].

5.1.3 Sättigungsuntersuchungen an einzelnen TDI-Molekülen

Die Linienverbreiterung und die Sättigung des Signals bei einer Erhöhung der Anregungsintensität verhält sich für die individuellen Moleküle entsprechend der Theorie. In Abb. 5.4 (a) sind zwei Anregungslinien für verschiedene Intensitäten abgebildet. Die untere Linie hat eine Halbwertsbreite von 46 MHz. Das obere Spektrum ist mit 10facher Intensität aufgenommen und zeigt eine Verbreiterung auf 69 MHz, weil der Sättigungsprozess im Zentrum der Linie schon dominiert und in den Flügeln noch unbedeutend ist. Die Sättigung ist auch an der maximalen Zählrate klar erkennbar. Während der Untergrund im oberen Spektrum auf den zehnfachen Wert ansteigt, nimmt das Signal nur auf den sechsfachen Wert des unteren Spektrums zu. Die Zunahme der relativen Aufenthaltswahrscheinlichkeit im angeregten Zustand und in Dunkelzuständen ist bei stärkerer Anregung nicht mehr vernachlässigbar und blockiert den linearen Zuwachs an Fluoreszenzintensität.

Die Auswertung der Messdaten und der Vergleich mit der Theorie (Gln. 3.11 und 3.12) zeigen gute Übereinstimmung, wie in Abb. 5.4 (b,c) dargestellt ist. Die experimentellen Werte zeigen innerhalb der Fehlergrenzen keine Abweichungen von dem erwarteten Verhalten. Bei Extrapolation auf unendlich hohe Intensität erhält man eine Zählrate von über 450 000 Counts pro Sekunde von diesem einzelnen Quantensystem. Die totale Fluoreszenzrate kann mit Gl. 3.10, der Lebenszeit von 3,5 ns und einer Fluoreszenzquantenausbeute nahe 1 (zunächst unter Vernachlässigung des Triplettzustands) zu 10^8 s^{-1} abgeschätzt werden. Nimmt man eine Detektionseffizienz η_{det} von 0,5 % an, ist die detektierte Emissionsrate in guter Übereinstimmung mit der gemessenen Zählrate. Die Linienbreite nimmt von 46 MHz ausgehend zu und hat keine obere Grenze. Der Minimalwert übersteigt möglicherweise durch Phasenrelaxationen oder Kopplung des Übergangs an TLS schon den lebensdauerlimitierten Wert oder entspricht diesem bei Streuung der individuellen Lebenszeiten.

Im oberen Spektrum von Abb. 5.4 (a) mit hoher Intensität zeigen sich Unterbrechungen der Fluoreszenz während des Frequenzscans. Da diese mit ca. 100 ms (die Integrationszeit pro Punkt ist 90 ms) zu lange für Triplettlebenszeiten

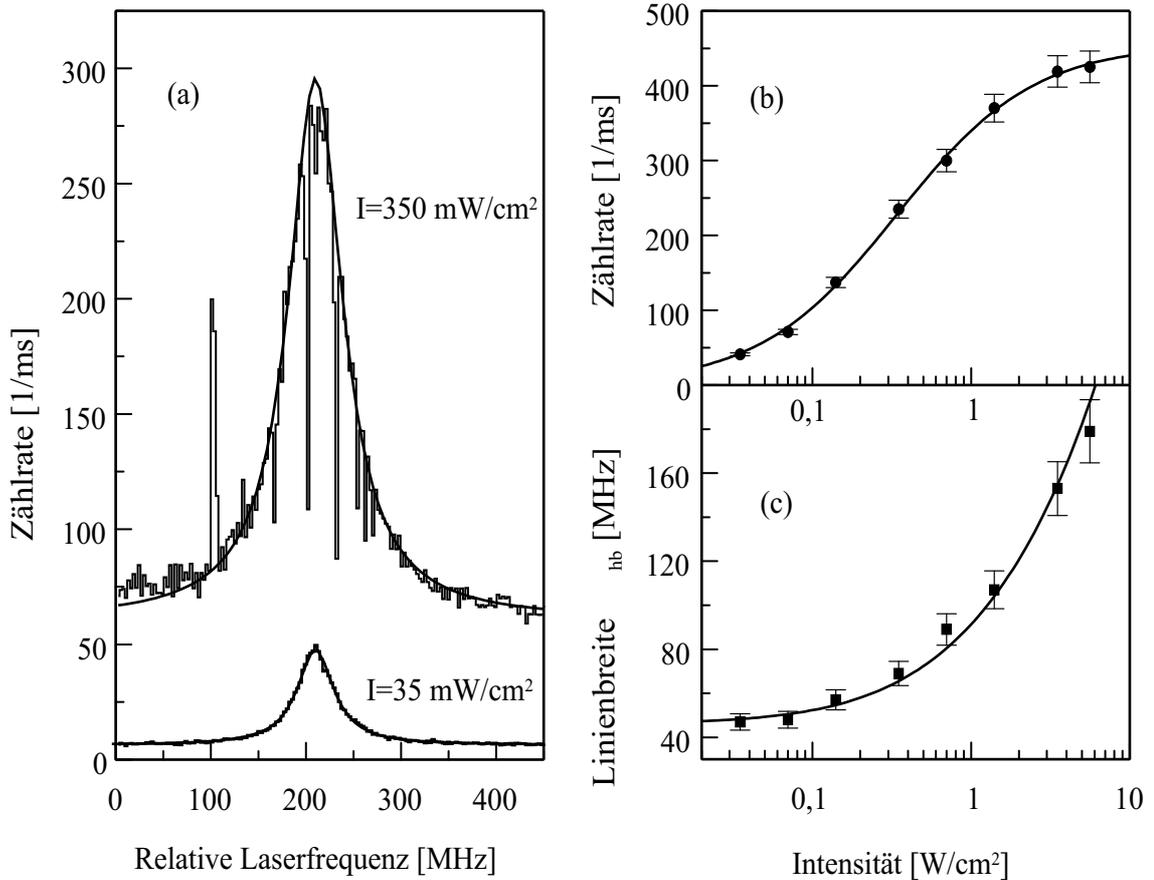


Abbildung 5.4: (a) Fluoreszenzanregungsspektren eines einzelnen TDI-Moleküls bei zwei verschiedenen Anregungsintensitäten ($T = 1,4 \text{ K}$, $0 \text{ GHz} \equiv 659,01 \text{ nm}$). Die Anpassung von Lorentzkurven an die Messdaten liefert die Daten zur Analyse des Sättigungsverhaltens (unten: Signal = 41 Counts/ms, Untergrund = 6 Counts/ms, $\Delta\nu_{hb} = 46 \text{ MHz}$; oben: Signal = 235 Counts/ms, Untergrund = 61 Counts/ms, $\Delta\nu_{hb} = 69 \text{ MHz}$). (b,c) Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenzzählrate (Signal) und der Linienbreite $\Delta\nu_{hb}$ in halblogarithmischer Darstellung, zusammen mit den theoretischen Kurven nach Gln. 3.11 und 3.12 ($R_{\infty}^{3LS} \cdot \eta_{det} = 455 \text{ C/ms}$, $I_S = 340 \text{ mW/cm}^2$). Die Fehler wurden aus wiederholten Messungen zu 5 bzw. 8 % abgeschätzt.

sind, müssen sie mit lichtinduzierten Sprüngen der molekularen Absorptionslinie im Frequenzraum interpretiert werden. Bei dieser hohen Intensität sind die zahlreichen Absorption/Emission-Zyklen des Moleküls von einer nicht vernachlässigbaren Energie- und Wärmezuführung in die Matrix begleitet. Dies kann zu einer Änderung der molekularen Umgebung und damit zu einer anderen Absorptionsfrequenz führen. Ein typischer lichtinduzierter Frequenzsprung ist möglicherweise 100 MHz zu kleineren Energien und wird durch die kurzzeitige Fluoreszenzerscheinung am linken Rand des oberen Spektrums angedeutet. Häufig, wie im Fall dieses Moleküls, sind diese

Frequenzsprünge reversibel und die Absorptionslinie kehrt an ihre vorherige Position zurück. Im Spektrum bleiben dann nur einige Dunkelperioden. In einigen Fällen ist dieser Lochbrennprozess auf der Basis einzelner Moleküle irreversibel und die Moleküle bleiben auf den neuen Frequenzpositionen. Dann ist das Wiederfinden der Absorptionslinie eines individuellen Moleküls im Frequenzraum meist unmöglich.

5.1.4 Tripletttraten einzelner TDI-Moleküle

Zur Bestimmung der Populations- und Depopulationsraten des Triplettts wurde die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität einzelner TDI-Moleküle in HD aufgenommen. Die Dunkelzeiten, während derer das Molekül strahlungslos im Triplettzustand verweilt, führen zu einem exponentiellen Abfall der Korrelationsfunktion mit einer Zeitkonstante, die durch die Summe der effektiven Rate in den Triplettzustand und der Rate aus dem Triplettzustand gegeben ist. Von mehr als hundert detektierten Molekülen überstanden den intensitätsabhängigen Messzyklus nur Zwei. Die Korrelationsfunktionen dieser beiden Moleküle zeigen bei Darstellung mit logarithmischer Zeitachse (Abb. 5.5 a) drei Stufen in den Zeitbereichen um 0,1 ms, 1 ms und 100 ms. Durch das Auftreten dreier Dunkelzustände reicht die einfache Beschreibung, wie im theoretischen Teil in Kapitel 3 durchgeführt, nicht aus. Entsprechend wurde die Korrelationsfunktion auf drei Exponentialterme erweitert:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + C_1 e^{-K_1 \tau} + C_2 e^{-K_2 \tau} + C_3 e^{-K_3 \tau} \quad (5.1)$$

Wie später erklärt wird, kann der exponentielle Zerfall um 100 ms nicht mit einer Triplettodynamik in Verbindung gebracht werden, sondern scheint infolge spektraler Diffusion aufzutreten. Nur die ersten beiden exponentiellen Zerfälle werden Singulett-Triplett Interkombinationen zugeordnet. Da der Hauptanteil des TDI-Moleküls, der das konjugierte π System bildet, als planar angesehen werden kann, ist in Analogie zu Terrylen [148] der schnelle Zerfall (indiziert mit $i = 1$) den beiden Triplett-Subniveaus T_x und T_y (x,y-Achsen in der Molekülebene) zuzuordnen, und der langsame Zerfall ($i = 2$) dem Subniveau T_z (z-Achse senkrecht zur Molekülebene). Die beiden Subniveaus T_x und T_y können wegen ihrer näherungsweise identischen Raten nicht unterschieden werden.

Zur Bestimmung der ISC Raten wurden durch den vereinfachten Ansatz als Summe dreier Exponentialterme die Besetzungen der Subniveaus in erster Näherung als unabhängig betrachtet, da bei tiefen Temperaturen die Mischung zwischen den Subniveaus durch Spin-Gitter-Relaxationen noch nicht effektiv ist. Es wurde deshalb der

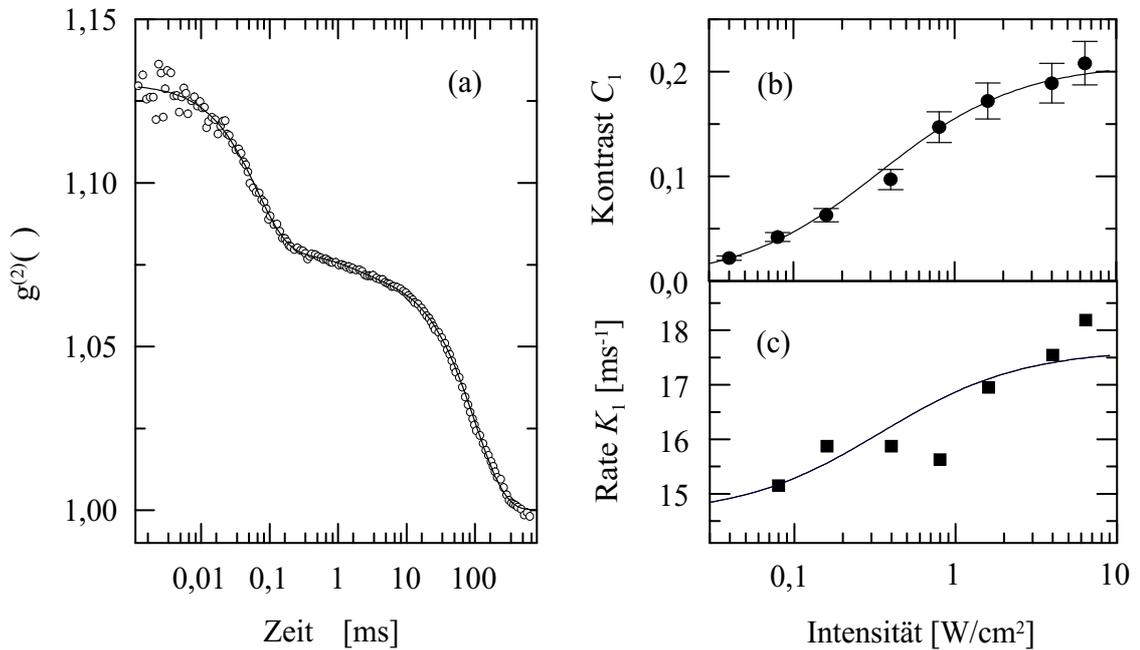


Abbildung 5.5: (a) Normierte Intensitätsautokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ der Fluoreszenzemission eines einzelnen TDI-Moleküls bei einer Anregungsintensität von $0,8 \text{ W/cm}^2$ (Aufnahmedauer ca. 100 s). Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung von Gl. 5.1 an die Daten, die $K_1^{-1} = 66 \mu\text{s}$, $K_2^{-1} = 1,7 \text{ ms}$ und $K_3^{-1} = 101 \text{ ms}$ liefert. Die zweite Stufe ist kaum sichtbar, jedoch notwendig um eine zufriedenstellende Anpassung zu erreichen. (b,c) untergrundkorrigierte Kontraste C_1 und Raten K_1 für den ersten exponentiellen Zerfall in $g^{(2)}(\tau)$ in Abhängigkeit der Anregungsintensität (logarithmisch skaliert). Der Verlauf kann mit der Theorie (Gln. 3.24) gut reproduziert werden. Die Kontrastfehler werden als kleiner 10 % angenommen. Die Anpassung ergibt $k_{23}^{(1)} = 6,1 \text{ ms}^{-1}$ und $k_{31}^{(1)} = 14,6 \text{ ms}^{-1}$ für die Subniveaus T_x, T_y .

Formalismus wie für ein einfaches 3-Niveau System für jeden der drei unterscheidbaren Dunkelzustände angewendet. Um die Kopplung der Niveaus untereinander einzubeziehen, müsste das Ratengleichungssystem für ein 4 (bzw. 5)-Niveau System gelöst werden [150]. Der nachträgliche Vergleich zeigt jedoch, dass im vorliegenden Fall die daraus resultierenden Abweichungen für die Raten innerhalb ihrer Fehlergrenzen liegen.

Für die Auswertung wurden zunächst alle Korrelationskurven durch Gl. 5.1 angepasst und die Kontraste C_i und Raten K_i bestimmt. Um systematische Fehler auszuschließen, müssen genügend viele Messpunkte einbezogen werden, so dass in logarithmischer Darstellung die Plateaus für extrem kurze und lange Zeiten eindeutig erkannt werden können. Für jede Intensität wurden mehrere Korrelationsdatensätze aufgenommen und ausgewertet und daraus der Fehlerbereich und die

Tabelle 5.2: Mittlere ISC Raten $k_{23}^{(i)}$ und $k_{31}^{(i)}$ von zwei TDI-Molekülen in HD, bestimmt über die Intensitätsabhängigkeit der Raten und Kontraste der Korrelationsfunktion.

			Subniveaus T_x, T_y ($i=1$)	Subniveau T_z ($i=2$)
Mol. A	k_{23}	$[\text{ms}^{-1}]$	$6,1 \pm 2$	<1
	k_{31}	$[\text{ms}^{-1}]$	$14,6 \pm 1$	$1 \pm 0,5$
Mol. B	k_{23}	$[\text{ms}^{-1}]$	$3,2 \pm 2$	<2
	k_{31}	$[\text{ms}^{-1}]$	$15,5 \pm 1$	$2 \pm 0,5$

Reproduzierbarkeit abgeleitet. Die Kontraste C_i wurden nach Gl. 3.25 korrigiert. Die dazu notwendigen Informationen wurden aus Anregungsspektren entnommen, die zusätzlich zu $g^{(2)}(\tau)$ bei jeder Intensität aufgenommen wurden. Die Raten in den Tripletzustand $k_{23}^{(i)}$ sowie aus ihm heraus $k_{31}^{(i)}$ können im Prinzip aus der Intensitätsabhängigkeit des Ratenparameters K_i alleine nach 3.24 bestimmt werden. Zur Minimierung des Fehlers wurden auch die Kontraste C_i einbezogen, in deren Intensitätsabhängigkeit das Verhältnis der Triplettraten $k_{23}^{(i)}/k_{31}^{(i)}$ steckt. Die Werte von C_1 und K_1 sind in Abb. 5.5 (b,c) zusammen mit den theoretischen Kurven dargestellt. Aus der Anpassung erhält man $k_{23}^{(1)} = 6,1 \text{ ms}^{-1}$ und $k_{31}^{(1)} = 14,6 \text{ ms}^{-1}$ für die Subniveaus T_x, T_y . Die Analyse des zweiten exponentiellen Zerfalls zur Bestimmung der Raten von T_z war in derselben Weise nicht möglich, weil der zugehörige Kontrast C_2 extrem klein war. Es gelang nur $k_{31}^{(2)}$ zu bestimmen, das als Grenzwert von K_2 für kleine Intensitäten auftritt. Für die Rate $k_{23}^{(2)}$ kann nur eine obere Grenze angegeben werden. In Tabelle 5.2 sind die mittleren Populations- und Depopulationsraten der beiden unterscheidbaren Triplet-Subniveaus zusammengefasst. Ähnlich wie bei Terrylen sind die Populationsraten $k_{23}^{(i)}$ kleiner als die Depopulationsraten $k_{31}^{(i)}$, die ihrerseits noch deutlich kleiner als die Fluoreszenzrate sind. Dies verursacht die geringe Tripletbesetzung und die starke Fluoreszenzemission von TDI.

Die Intensitätsabhängigkeit des wahren Kontrastes C_3 des dritten Exponenten zeigt ein anderes Verhalten, als für Singulett-Triplett Übergänge vorhergesagt wird. C_3 verschwindet bei hohen Intensitäten wieder (siehe Abb. 5.6 b). Es ist deshalb anzunehmen, dass dieser Zerfall von spektraler Diffusion stammt. Ein einzelnes TLS in der Nachbarschaft des Moleküls führt zu einer zweiten Absorptionsfrequenz, die je nach aktuellem TLS Zustand auftritt. Bei der anderen Absorptionsfrequenz wird das Molekül nicht mehr oder zumindest nicht mehr so stark angeregt. Es treten plötzliche Fluoreszenzänderungen auf und damit ein Zerfall in der Korrelationsfunktion. Ein Hinweis auf eine derartige zweite Absorptionsfrequenz ist (wie schon bei der Sättigung erwähnt) in den Fluoreszenzanregungsspektren sichtbar.

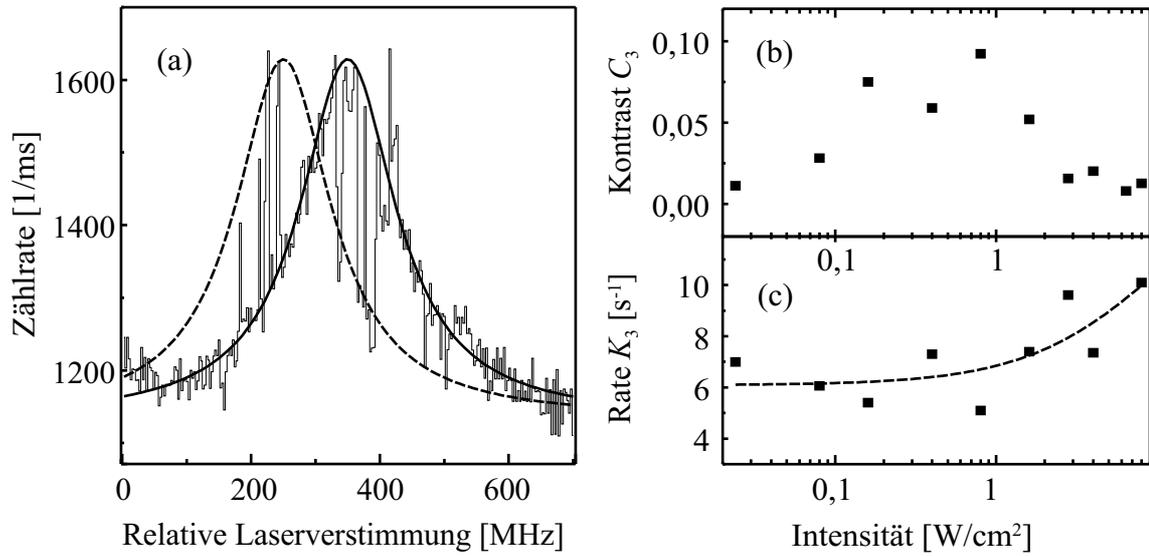


Abbildung 5.6: (a) Fluoreszenzanregungsspektrum von TDI in HD bei 1,4 K (0 GHz \equiv 659,01 nm, $I = 6$ W/cm²). Die durchgezogene Linie ist eine (optisch) angepasste Lorentzkurve. Die gestrichelte Linie ist der identische Graph um 100 MHz verschoben. Er trifft viele der Messpunkte, die vom ersten Graph abweichen. Diese Linie wird als zweites Absorptionsspektrum interpretiert, das nach dem Flip eines dominanten TLS auftritt. (b,c) Untergrund-korrigierte Kontraste C_3 und Raten K_3 für den dritten exponentiellen Zerfall in $g^{(2)}(\tau)$ in Abhängigkeit der Anregungsintensität (logarithmisch skaliert; durchgezogene Linie für K_3 : Anpassung analog wie für Triplett; näheres siehe Text).

In Abb. 5.6 (a) ist ein derartiges Spektrum dargestellt. Es wurde bei sehr hohen Intensitäten von 6 W/cm² aufgenommen und lässt sich durch eine Lorentzlinie anpassen (durchgezogene Linie). Viele Messpunkte zeigen jedoch Abweichungen, die ihrerseits aber näherungsweise auf einer identischen, nur um 100 MHz verschobenen Lorentzlinie liegen (gestrichelte Linie). Regt man bei der einen Position im Maximum an, trifft man die andere Position nur in der Flanke. Die beobachtete Erniedrigung des Kontrastes bei hohen Intensitäten ist nun mit der Sättigungsverbreiterung leicht zu erklären: Führt sie zu Linienbreiten in der Größenordnung der 100 MHz und mehr, dann verschmelzen beide Positionen ineinander und werden immer ähnlicher. Damit treten keine Intensitätsfluktuationen mehr auf und der Zerfall verschwindet in der Korrelationsfunktion. Im Falle spontaner TLS Zustandsänderungen und unter der Annahme, dass immer nur für einen TLS Zustand die zugehörige Absorptionslinie mit der Anregung überlappt und zu Fluoreszenz führt, ist die Zerfallsrate K_3 die Summe der Raten für den TLS Zustandswechsel $k_{\rightarrow} + k_{\leftarrow}$. Für niedrige Intensitäten ergibt sich dafür auch ein konstanter Wert K_3 um 6 s⁻¹, wie in Abb. 5.6 (c) sichtbar ist. Bei höheren Intensitäten scheint die Rate K_3 aber leicht zuzunehmen, so dass lichtinduzierte Beiträge zu berücksichtigen sind. Im Falle eines rein lichtinduzierten

Prozesses, also von TLS Flips, die zur zweiten Absorptionsfrequenz nur über den angeregten Zustand des Moleküls führen und spontan wieder zurück, ist die Situation analog zum Triplett, wobei k_{23} durch k_{\rightarrow} und k_{31} durch k_{\leftarrow} ersetzt wird. Durch die Schwankung der Messwerte kann aber nur k_{\leftarrow} als Grenzwert niedriger Intensität zu $6 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ angegeben werden. Erstaunlicherweise war der dritte Exponentialterm für beide Moleküle notwendig und zeigte ein ähnliches Verhalten.

5.1.5 Linienbreitenverteilungen

Niederfrequente Dynamik in der Matrix durch TLS zeigt sich auch in den unterschiedlichen Linienbreiten einzelner Moleküle in einer Probe bei gleicher Temperatur. Zur Aufstellung einer Linienbreitenverteilung wurden die Halbwertsbreiten von 107 TDI-Molekülen in HD (Probe I, mit Methylenchlorid verunreinigt) und von 97 Molekülen in PE durch Anpassung von Lorentzkurven an die Spektren bestimmt. Alle Linien wurden bei einer Temperatur von 2,5 K und Intensitäten unter 30 mW/cm^2 detektiert, um Leistungsverbreiterung auszuschließen. Die sich ergebenden Histogramme sind in Abb. 5.7 dargestellt und demonstrieren, dass die „homogenen“ Linien nicht homogen sind, sondern eine Verteilung aufweisen. Viele Linien sind gegenüber dem lebensdauerlimitierten Wert von $\sim 40 \text{ MHz}$, bei dem die Verteilungen mit einer scharfen Kante beginnen, auf Werte um 100 MHz in HD und über 300 MHz in PE verbreitert.

Dieses Verhalten wurde schon für Terrylen in Polymer- [151, 152] und Shpol'skii- [152, 153, 154] Matrizen, Terrylen in Anthracen [152] und Tetra-*tert*-butylterrylen in Polyisobutylen [16] beobachtet und durch spektrale Diffusion erklärt. Jedes Molekül koppelt an einen individuellen Satz von TLS, deren Flips zu Fluktuationen der Resonanzfrequenz führen und damit zu einer Verbreiterung. Vergleicht man die Daten mit der bisherigen Literatur, stellt man fest, dass die Verteilungen für eine spezielle Wirtsmatrix immer sehr ähnlich sind und im Wesentlichen unabhängig vom Gastmolekül sind, obwohl TDI und Terrylen ziemlich unterschiedliche Formen besitzen. Linienbreitenverteilungen zu messen ist damit eine geeignete Methode, die Unordnung des Gastmaterials zu charakterisieren.

Zur theoretischen Auswertung wurde die statistische Methode nach Stoneham [116] verwendet, die schon von Fleury et al. [151] auf Linienbreitenverteilungen angewendet wurde und in Kapitel 3.2.3 ausführlich dargestellt ist. Die spezielle Anordnung von N TLS um ein individuelles Molekül (siehe Abb. 3.7) führt danach zu einer individuellen Linienbreite $\Delta\nu$ dieses Moleküls, die im Wesentlichen von der Anzahl N der ankoppelnden TLS und den Abständen r_i dieser N TLS_{*i*} vom Molekül, sowie

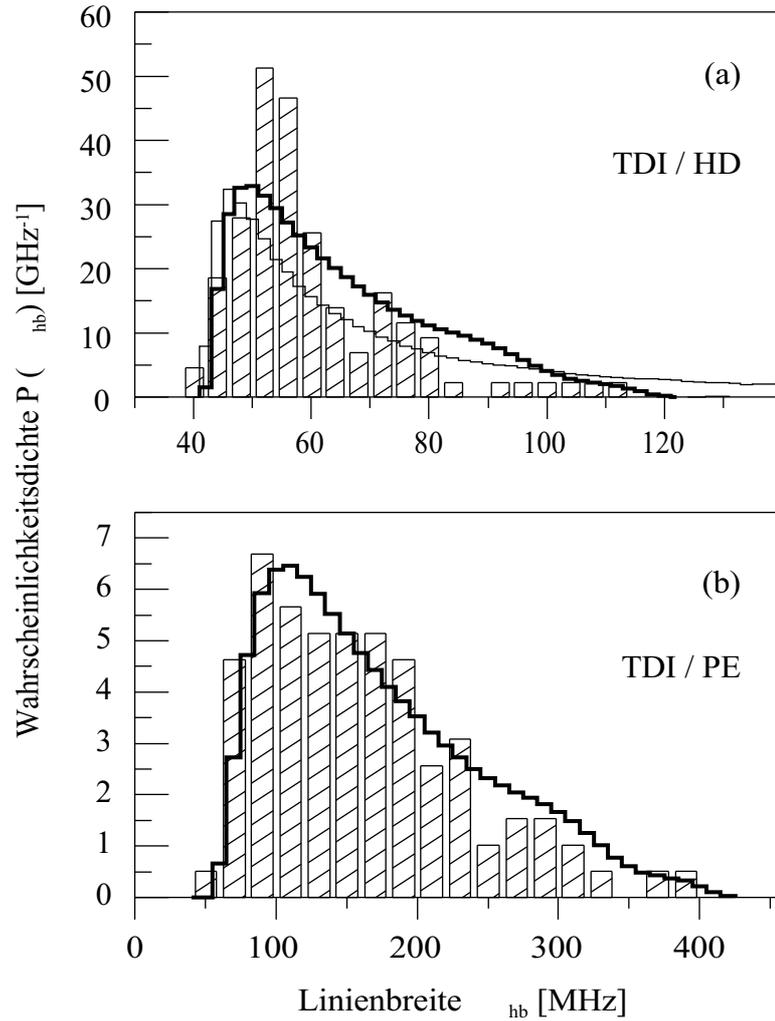


Abbildung 5.7: Histogramme der Linienbreitenverteilungen von TDI in (a) HD (Probe I) und (b) PE bei 2,5 K. Die Achsen sind dabei verschieden skaliert, da in der PE Matrix deutlich breitere Linien auftraten. Die durchgezogenen Linien sind numerische Kalkulationen nach Gln. 3.40 (Parameter: $\Delta\nu_0 = 40$ MHz für alle; (a) dicke Linie: $\Lambda = 40$ MHz, $r_{min}/r_{TLS} = 0,48$; dünne Linie: $\Lambda = 150$ MHz, $r_{min}/r_{TLS} = 0,29$; (b) $\Lambda = 150$ MHz, $r_{min}/r_{TLS} = 0,45$).

vom Parameter Λ abhängt:

$$\Delta\nu = \sqrt{\Delta\nu_0 + 4\Lambda^2 \sum_{i=1}^N \frac{r_{min}^6}{r_i^6}} \quad (5.2)$$

Λ ist dabei ein Maß für die Stärke der Verbreiterung. Ein Flip eines TLS im charakteristischen Abstand r_{min} vom Molekül führt gerade zu einer Linienverschiebung

von 2Λ . Als universelle TLS-Chromophor Kopplungskonstante wird α_c als $\Lambda \times r_{min}^3$ definiert.

Aus den auftretenden Linienbreiten und deren Verteilung lässt sich schließlich auf die mittlere Verteilung an TLS in der Matrix und damit auf die TLS-Dichte $\rho_{TLS} = \frac{N}{V} = 1/r_{TLS}^3$ in der Probe zurückschließen (r_{TLS} ist der mittlere TLS-Abstand). Diese ist wiederum ein Maß für die Unordnung der Matrix. Die beiden veränderbaren Parameter bei der theoretischen Anpassung sind die Linienverschiebung Λ , sowie der Quotient r_{min}/r_{TLS} .

Die Ergebnisse sind in Abb. 5.7 eingezeichnet. Gute Übereinstimmung wurde bei der Probe TDI / PE für die Werte $\Lambda = 150$ MHz sowie $r_{min}/r_{TLS} = 0,45$ gefunden. Für TDI in HD war die Prozedur etwas schwieriger, wobei zuerst versucht wurde, denselben Wert für Λ zu verwenden. Danach hätten Absorptionslinien breiter als 120 MHz auftreten müssen (dünne Linie in Abb. 5.7 a), was nicht der Fall war. Derartig breite Linien hätten beobachtet werden können, da in den temperaturabhängigen Messungen Linien mit Breiten > 4 GHz bei höheren Temperaturen detektiert wurden. Es wurde schließlich auch Λ variiert und die beste Übereinstimmung für $\Lambda = 40$ MHz sowie $r_{min}/r_{TLS} = 0,48$ gefunden. Die TLS-Chromophor Kopplungskonstante α_c ($= \Lambda \times r_{min}^3$) und die TLS-Dichte ρ_{TLS} ($= 1/r_{TLS}^3$) können aber ohne die Kenntnis von r_{min} nicht aus den Fit-Ergebnissen gewonnen werden. Es ist jedoch möglich, das Produkt von α_c und ρ_{TLS} zu berechnen, das gleich $\Lambda \cdot (r_{min}/r_{TLS})^3$ ist. Der Wert von $\alpha_c \cdot \rho_{TLS}$ ist ein Maß für die Linienverbreiterung in einer spezifischen Matrix und ergibt 14 MHz für PE und 4,4 MHz für HD.

Der Parameter $\rho_{TLS} = 1/r_{TLS}^3$ ist ein Maß für die Unordnung in einer gegebenen Matrix, kann jedoch ohne die Kenntnis von r_{min} nicht aus den experimentellen Daten bestimmt werden. Da r_{min} nicht berechnet werden kann, werden Daten aus der Literatur für das weitere Vorgehen benötigt. Geva und Skinner haben Werte für TLS-Chromophor Kopplungskonstanten berichtet [113]. Ihre Definition der Kopplungskonstante α'_c steht mit der hier verwendeten über $\alpha'_c(A_i/E_i) = \Lambda r_{min}^3 = \alpha_c$ in Beziehung, wobei A_i/E_i mit großer Wahrscheinlichkeit nahe bei 1 liegt (Details sind [113] zu entnehmen). Für Terrylen / PE finden sie einen Wert von 12 GHz nm³ und für Tetra-*tert*-butylterrylen / PE einen Wert von 30 GHz nm³. Bei dem hier verwendeten System kann man davon ausgehen, dass α_c in derselben Größenordnung liegt, so dass wir einen Wert von 20 GHz nm³ für die weiteren Berechnungen verwenden. Dies führt zu einem Wert von 5 nm für r_{min} . Das Ergebnis ist sehr vernünftig: r_{min} muss deutlich größer sein als die molekularen Dimensionen ($r_{min} > 1$ nm). Außerdem kann, wie für Terrylen in *p*-Terphenyl gezeigt wurde, eine Änderung der Wirtsmatrix in der direkten Nachbarschaft des Moleküls zu einer geänderten Geometrie des Chromophors führen, was eine extrem große Frequenzverschiebung zur Folge hat

[32] und für r_{min} mindestens 1 nm erfordert. Auf der anderen Seite sollte $r_{min} < 10$ nm wegen der starken Abstandsabhängigkeit der Dipolwechselwirkung sein.

Bei Verwendung von $r_{min} = 5$ nm kann der typische Abstand r_{TLS} zwischen zwei TLS in PE zu 11 nm berechnet werden (dabei werden thermisch aktivierte TLS gezählt), womit sich eine TLS-Dichte ρ_{TLS} von $7 \times 10^{-4} \text{ nm}^{-3}$ in PE ergibt.

Nimmt man schließlich an, dass die TLS-Chromophor Kopplungskonstante α_c für das System TDI / HD wegen der ähnlichen chemischen Struktur ungefähr gleich groß ist wie bei TDI / PE, so kann die TLS-Dichte in der Hexadecan Matrix leicht berechnet werden. Der mittlere Abstand von thermisch aktiven TLS r_{TLS} nimmt auf 17 nm zu, was einer TLS-Dichte ρ_{TLS} von $2 \times 10^{-4} \text{ nm}^{-3}$ entspricht. Die Packung der Moleküle in der polykristallinen Matrix ist dichter als in der semikristallinen Matrix. Deshalb existiert weniger freies Volumen, das eine Umordnung des Wirtsmaterials erlaubt. Entsprechend bietet HD stabilere lokale Umgebungen für die Farbstoffmoleküle und der geringere Grad an Unordnung wird deutlich an dem etwa dreimal geringeren Wert der TLS-Dichte.

Diese Auswertung ist nur durch die Messung der gesamten Verteilung von auftretenden Linienbreiten möglich, die ausschließlich durch Einzelmolekülspektroskopie zugänglich ist. Bei anderen site-selektiven Untersuchungsmethoden erhält man jeweils nur einen Wert als zugehörige Linienbreite. Im Falle des spektralen Lochbrennens sollte dieser Wert der Mittelwert der Verteilung sein. Die Autoren von [152] bestätigen dies, während die Autoren von [155, 156] auch größere Werte als den Mittelwert für die Linienbreite in Lochbrennexperimenten beobachten. Als Erklärung geben sie an, dass Linienaufspaltungen in Einzelmolekülexperimenten möglicherweise übersehen werden, in Lochbrennexperimenten sich aber in einer Verbreiterung niederschlagen. Im Falle von Photonecho-Experimenten sollte man die minimale in Einzelmolekülexperimenten detektierbare Linienbreite erhalten, da sich in dieser Technik nur Verbreiterungsprozesse auswirken, deren Zeitkonstanten kleiner sind als die Lebenszeit des angeregten Zustands der Moleküle (also nur Dephasing-Prozesse und keine oder nur sehr schnelle spektrale Diffusion). Auch dies konnte an manchen Systemen bestätigt werden, an anderen wiederum nicht [155, 156]. Die Abweichungen werden hier durch eine Verteilung der Phasenrelaxationszeit T_2 erklärt. Dies hätte jedoch auf die Erklärung der Linienbreitenverteilung in Einzelmolekülexperimenten die Auswirkung, dass sie nicht mehr nur durch unterschiedliche spektrale Diffusion der einzelnen Moleküle zu erklären ist, sondern zusätzlich durch unterschiedliche T_2 -Zeiten. In den eigenen Experimenten wurde kein Hinweis auf derartige Effekte gefunden.

5.1.6 Temperaturabhängigkeit der Linienbreite und -form

Die Temperaturabhängigkeit von Linienbreitenverteilungen enthält keine wertvollen neuen Informationen, die nicht auch aus Messungen an Ensembles gewonnen werden könnten [118]. Ganz anders ist die Situation für die Temperaturabhängigkeit der Linienform einzelner Moleküle, womit die lokalen Umgebungen der Gastmoleküle und deren spezifische Wechselwirkung mit Phononen und TLS untersucht wird. Die Temperaturerhöhung führt zu einer Verschiebung und Verbreiterung der Linie, wie in Abb. 5.8 dargestellt.

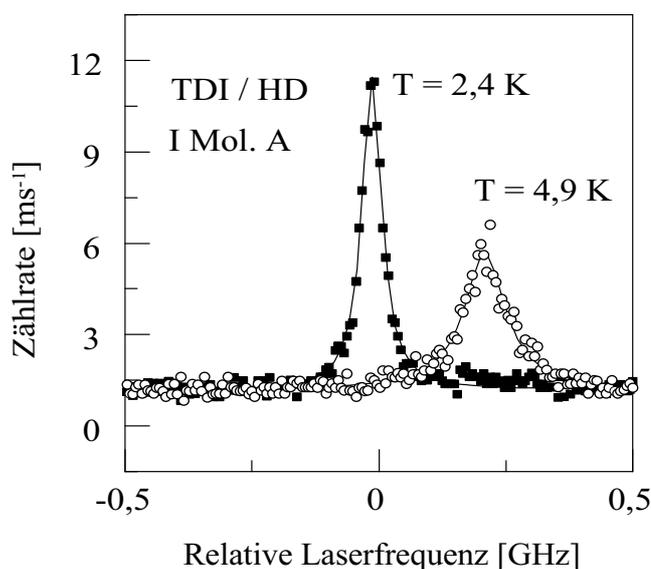


Abbildung 5.8: Fluoreszenzanregungsspektren eines einzelnen TDI-Moleküls in HD bei zwei verschiedenen Temperaturen ($0 \text{ GHz} \equiv 658,02 \text{ nm}$). Die durchgezogenen Linien sind Lorentzfits, die eine Verbreiterung von 47 auf 101 MHz und eine Verschiebung um 225 MHz für die Temperaturerhöhung von 2,4 auf 4,9 K ergeben.

Für Terrylen in PE [151] und auch in HD [153, 154, 157] wurden verschiedene Temperaturabhängigkeiten berichtet, z. B. lineare Zusammenhänge, Potenzgesetze und auch Arrheniusgesetze für thermisch aktivierte Übergänge. Daran zeigt sich die Heterogenität der Eigenschaften individueller Moleküle, die aus den Ergebnissen, die durch Mittelung über eine große Anzahl von Molekülen erzielt werden, nicht erkenntlich ist.

Zur Erweiterung des Verständnisses der Wechselwirkung der Sondenmoleküle mit den Wirtsmatrizen wurden die Linienbreite und auch die Linienposition als Funktion der Temperatur für mehrere TDI-Moleküle in zwei HD Proben und in PE ermittelt. Für die erste HD Probe wurde TDI zuerst in Methylenchlorid gelöst, so dass Verunreinigungen davon zu erwarten sind, bei der zweiten wurde TDI direkt

in HD gelöst. Dabei können sowohl die typischen Unterschiede der Wirtsmatrizen PE und HD aus den eigenen Messungen mit TDI gewonnen werden, als auch der Einfluss des Sondenmoleküls durch Vergleich mit den Daten von Terrylen in PE und HD aus der Literatur.

Ein experimentelles Problem bei den temperaturabhängigen Messungen war die spektrale Instabilität der Moleküle. Es wurde versucht, immer drei Anregungsspektren bei einer Temperatur aufzunehmen. Beginnend bei $\sim 2,5$ K wurde die Temperatur in Schritten von 0,5 oder 1 K erhöht bis zu einem Wert, bei dem das Signal-zu-Rauschen Verhältnis ungenügend zur Bestimmung der Linienform war. Dann wurde die Temperatur wieder erniedrigt auf $\sim 1,6$ K, um die Reproduzierbarkeit zu kontrollieren. Viele Moleküle überstanden diese Prozedur wiederholter Bestrahlung nicht und verschwanden durch einen spektralen Sprung aus dem Scanbereich. Manchmal wurden auch spektrale Sprünge innerhalb des Scanbereichs beobachtet (Mol. E in Abb. 5.9 a). Für Moleküle, bei denen eine ausreichende Anzahl von Spektren aufgenommen werden konnte, wurden die Linien mit Lorentzkurven angepasst und die Halbwertsbreiten $\Delta\nu_{hb}$ und die (relativen) spektralen Positionen δ_s bestimmt. Der Fehlerbereich ist für die Linienbreiten und Verschiebungen zu jeweils 5-10 % der Breiten aus den wiederholten Messungen bestimmt worden.

Die experimentellen Daten (Linienbreite $\Delta\nu_{hb}$ und relative Position δ_s) für 14 Moleküle sind in Abb. 5.9 und 5.10 dargestellt. Alle Moleküle zeigen eine Verbreiterung der Linie mit zunehmender Temperatur. Die Linienverschiebung ist für einzelne Moleküle aber unterschiedlich. Die meisten zeigen einen Blaushift bei höheren Temperaturen, häufig konkurriert aber im unteren Temperaturbereich ein Prozess, der zu einem Rotshift führt.

Durch Verwendung der Formeln 3.49 aus Kapitel 3.2.4 werden in der theoretischen Beschreibung die Beiträge von TLS und Phononen berücksichtigt. Der Effekt von TLS sollte analog zu den Ergebnissen aus den Linienbreitenverteilungen in der PE Probe ausgeprägter sein. Dieser Einfluss ist der dominante Effekt im niedrigen Temperaturbereich, weil hier immer noch Tunnelprozesse und damit TLS Flips auftreten. Die Kopplung an Phononen kann unter 2 K vernachlässigt werden, wie es schon bei der Theorie der Linienbreitenverteilung getan wurde. Dieser Beitrag gewinnt erst bei höheren Temperaturen ($T > 3$ K) an Bedeutung.

In der theoretischen Beschreibung der Linienverschiebung tritt durch Einbeziehung von thermischer Ausdehnung der Matrix ein komplexer Integralterm auf. Die darin auftretenden Parameter sind jedoch größtenteils in der Literatur beschrieben. Der thermische Längenausdehnungskoeffizient α_{lin} ist für PE verschiedener Kristallinitäten ($\chi = 1$: kristallin, $\chi = 0$: amorph) im gewünschten Temperaturbereich in

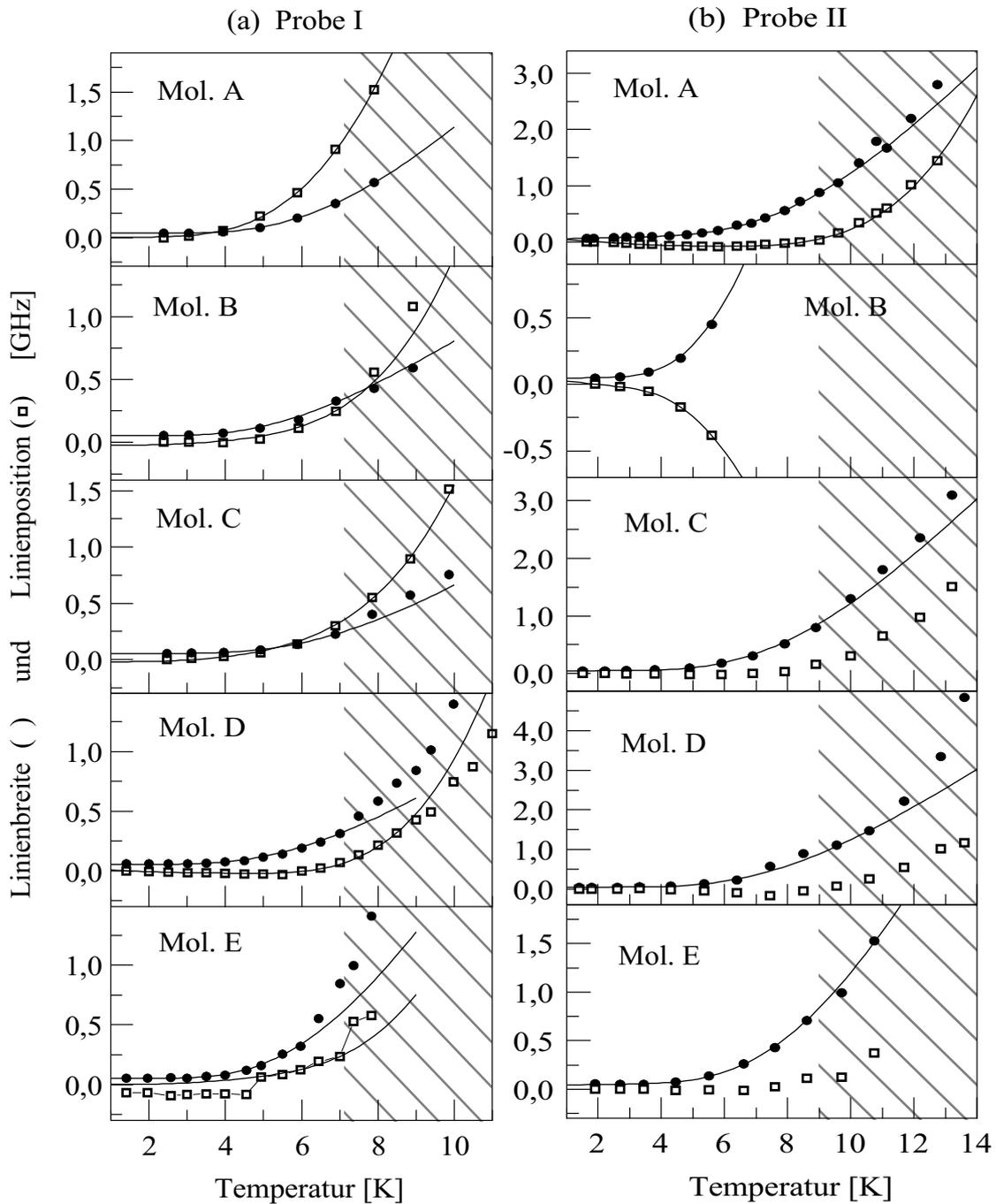


Abbildung 5.9: Temperaturabhängigkeit der Linienbreite $\Delta\nu_{hb}$ (volle Kreise) und spektralen Position (offene Vierecke) der Nullphononenlinien einzelner TDI-Moleküle in HD. (a) Probe I, bei der TDI in Methylenchlorid vorgelöst wurde, (b) Probe II, bei der TDI direkt in HD gelöst wurde. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen nach Formeln 3.49 bzw. 5.3 und 5.4 im unteren Temperaturbereich ($T \leq 7$ K für Probe I bzw. $T \leq 9$ K für Probe II; im schraffierten Bereich ist die Verwendung der genäherten Funktion nicht mehr gerechtfertigt; Datenpunkte aus diesem Bereich sind für die Anpassung nicht berücksichtigt). Die Parameter sind in Tabelle 5.3 aufgelistet.

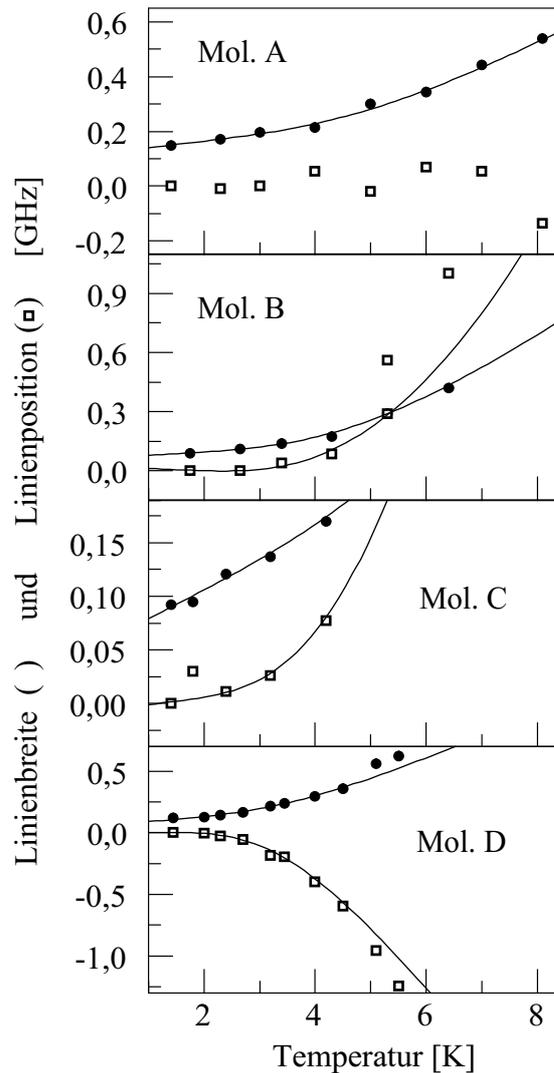


Abbildung 5.10: Wie Abb. 5.9 für TDI / PE

[158] tabelliert und konnte durch die analytische Funktion $\alpha_{lin} = (3,3 - 2,6\chi) 10^{-9} \text{ K}^{-4} \times T^3$ im Temperaturbereich zwischen 0 und 10 K approximiert werden. Für die isotherme Kompressibilität κ wird der Wert $0,13 \text{ GPa}^{-1}$ aus [126] entnommen. Experimentelle Untersuchungen zur Verschiebung durch hydrostatischen Druck wurden an einzelnen Pentacen- [21] und Terrylen-Molekülen [159] in *p*-Terphenyl durchgeführt, und mit Lochbrennen an Phthalocyanin in Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyrol und PE [126]. Alle Autoren berichten von einer linearen Rotverschiebung bei zunehmendem Druck. Die Verschiebungsparameter $(\partial\nu/\partial p)_T$ betragen $\sim -1 \text{ MHz/hPa}$ in kristallinen und $\sim -0,6 \text{ MHz/hPa}$ in Polymerproben. In den Lochbrennexperimenten wurde keine Temperaturabhängigkeit des Verschiebungsparameter

rameters gefunden und in den Einzelmolekülexperimenten keine Druckverbreiterung beobachtet. Damit lässt sich der Integralterm inklusive Vorfaktoren aus 3.49 ersetzen durch $-c_{vol} T^4$ mit c_{vol} in der Größe von 0,1 MHz/K⁴ (für semikristallines PE). Für HD wird von einer ähnlichen Abhängigkeit ausgegangen mit c_{vol} in derselben Größenordnung.

Bei der Anpassung der nun erhaltenen Gleichungen für die Linienbreite und die Verschiebung stellt man fest, dass die Variation des Exponenten α zwischen den sinnvollen Werten 1 und etwa 1,5 nur sehr geringe Veränderungen im Kurvenverlauf erzeugt. Andererseits ist es nicht möglich, aus den Messungen ein scharf definiertes α zu bestimmen. Es wurde deshalb α gleich 1 gesetzt, so dass die zur Anpassung der Messdaten verwendeten Formeln lauten:

$$\Delta\nu_{hb}(T) = \Delta\nu_{hb_0} + a_w T + b_w e^{-\frac{T_0}{T}} \quad (5.3)$$

$$\delta_s(T) = \delta_0 + a_s T + b_s e^{-\frac{T_0}{T}} - c_{vol} T^4 \quad (5.4)$$

Um die theoretischen Parameter nun aus den Daten zu erhalten, wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde Gl. 5.3 an die Daten der Linienbreiten im unteren Temperaturbereich angepasst, um $\Delta\nu_{hb_0}$, a_w , b_w und T_0 zu erhalten. Das Tieftemperaturlimit der Linienbreite $\Delta\nu_{hb_0}$ wurde dabei nicht bei 40 MHz festgehalten, zeigte aber auch keine größeren Abweichungen. T_0 und b_w sind gegenseitig schwach voneinander abhängig, so dass eine geringfügige Erhöhung des einen Parameters auch zu einem höheren Wert des anderen Parameters führt. Insgesamt konnten die Werte aller vier Parameter aber ziemlich eindeutig bestimmt werden. Wenn damit T_0 aus den Daten der Linienbreiten bekannt ist, wurde es bei der Anpassung der Funktion 5.4 an die Verschiebungsdaten verwendet und festgehalten. Anders war es gewöhnlich nicht möglich, alle freien Parameter in 5.4 zu bestimmen. Für c_{vol} wurden nur geringe Abweichungen vom abgeschätzten Wert erlaubt und schließlich ein für alle Moleküle einer Probe geeigneter Wert festgehalten. Man erkennt leicht, dass die Volumenexpansion der Matrix aufgrund der T^4 -Abhängigkeit ein wichtiger und einflussreicher Beitrag zur Linienverschiebung ist. Deshalb können kleine Fehler in c_{vol} große Fehler von b_s , dem präexponentiellen Faktor des Arrhenius-Terms, verursachen. Es muss erwähnt werden, dass gelegentlich auch eine Anpassung ohne den Term der Volumenexpansion möglich gewesen wäre. Dies hat aber immer zu einer sehr hohen und damit unvernünftigen Phononenenergie geführt.

Die Ergebnisse der Anpassungen sind in Tabelle 5.3 aufgelistet und die zugehörigen Graphen in den Abbildungen 5.9 und 5.10 eingezeichnet. Sie zeigen klare Unterschiede für alle drei Proben, die den unterschiedlichen Grad an Unordnung in den

Tabelle 5.3: Parameter von Gln. 5.3 und 5.4, die zur Anpassung der theoretischen Ausdrücke an die experimentellen Daten gewählt wurden (Bemerkung: Die Werte für T_0 wurden aus der Anpassung an die Daten der Linienbreiten erhalten. Diese Werte T_0 wurden zu Anpassung der Kurven an die Daten der Linienverschiebung verwendet. Außerdem wurde innerhalb der einzelnen Proben ein einheitlicher Wert für c_{vol} gefordert. Abkürzungen: n.= Wert nicht angebbbar; * = klar erkennbare spektrale Sprünge während des Messzyklus).

	λ_{abs} [nm]	Linienbreite				Linienverschiebung			
		$\Delta\nu_{hb_0}$ [MHz]	a_w [$\frac{\text{MHz}}{\text{K}}$]	b_w [GHz]	T_0 [K]	a_s [$\frac{\text{MHz}}{\text{K}}$]	b_s [GHz]	T_0 [K]	c_{vol} [$\frac{\text{MHz}}{\text{K}^4}$]
TDI/HD-I:									
Mol. A	658,0	45	0	18	28	0	26	28	0,2
Mol. B	658,7	53	0	7,5	23	0	-5	23	0,2
Mol. C	656,8	54	0	10	28	0	-7	28	0,2
Mol. D	656,5	55	0	8	24	-18	-10	24	0,2
Mol. E	655,8	53	0	22	26	0*	-10	26	0,2
TDI/HD-II:									
Mol. A	652,8	42	13	35	35	-45	-27	35	0,14
Mol. B	658,9	42	4	42	26	-29	-43	26	0,14
Mol. C	653,4	42	4	31	33		n.		
Mol. D	653,8	44	2	29	32		n.		
Mol. E	653,5	37	5	37	35		n.		
TDI / PE:									
Mol. A	662,8	116	24	3	21		n.*		
Mol. B	656,3	62	17	6	20	-14*	11	20	0,1
Mol. C	655,3	52	27	1	~20	5*	4	20	0,1
Mol. D	652,7	52	38	4	~15	0	-17	15	0,1

Matrizen und an Störungen durch die Einbettung des Chromophors in die Matrix reflektieren.

Probe I von TDI in HD (Abb. 5.9 a) scheint die kristallinste Struktur zu haben. Im Verhalten der Linienbreiten sind nur Dephasing-Effekte von pseudolokalen Phononen beobachtbar, wie es in einkristallinen Systemen der Fall ist [106], aber keine TLS Beiträge. Die Energien der Phononen liegen zwischen 16 und 20 cm^{-1} (T_0 : 23-28 K). Diese Werte sind sehr vernünftig, da auch Fluoreszenzspektren von einzelnen Molekülen in dieser Probe aufgenommen wurden, die Phononenpeaks im Abstand von $16 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ von vibronischen Übergängen zeigen. Die Fluoreszenzspektren sind in Abb. 5.11 dargestellt und zeigen nur den Fingerprint-Bereich, da beim 0-0 Über-

gang die Anregung erfolgte. Für diese Werte der Phononenenergien ist rückwirkend auch die Verwendung der arrheniusförmigen Näherungsausdrücke zur Beschreibung des Einflusses der pseudolokalen Phononen für $T \leq 7$ bzw. 9 K gerechtfertigt [119].

Aus den Daten der Linienverschiebung sind für die Moleküle D und E geringfügige TLS Beiträge erkennbar. Für die Verschiebung als Resultat der Phononenkopplung kann man verschiedene Richtungen finden. Molekül A wandert spektral nach blau und B bis E nach rot, was jedoch an den Graphen schwer zu erkennen ist, aus Tabelle 5.3 aber eindeutig hervorgeht. Es scheint, dass bei manchen Molekülen die Phononenenergie im angeregten Zustand höher ist als im Grundzustand und für andere gerade umgekehrt. Der dominante Beitrag zur Linienverschiebung ist jedoch die Volumenexpansion, die zu einem Blaushift nahezu aller Einzelmoleküle bei höheren Temperaturen führt.

Um die Theorie der pseudolokalen Phononen stärker zu testen, wurde versucht, mit Gl. 3.45 und 3.46 alle möglichen Phononeneigenschaften aus den präexponentiellen Faktoren b_w und b_s zu gewinnen. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde unabhängig die Phononenlebenszeit τ_0 aus der Breite der Phononenpeaks auf der Stokes-Seite der Vibrationsbanden in den Einzelmolekül-Fluoreszenzspektren (Abb. 5.11) zu 2 ps bestimmt. Die Halbwertsbreite dieser Peaks ist $7 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ bei einer instrumentellen Auflösung des Spektrographen von 4 cm^{-1} . Obwohl die bestimmte Lebenszeit nur eine grobe Abschätzung ist und sein soll, ist ihr Wert in guter Übereinstimmung mit den temperaturabhängigen Messungen an Molekül A. Man findet $\tau_0 = 2,5 \text{ ps}$ und einen Energiedifferenz $\delta\nu$ des Phonons im Grund- und angeregten Zustand von $0,9 \text{ cm}^{-1}$ (26 GHz). Innerhalb der Fehlergrenzen erhält man bis zu einer Größenordnung längere Lebenszeiten für die anderen Moleküle. Die Lebenszeiten scheinen breit verteilt zu sein, was nicht im Widerspruch zu den Fluoreszenzspektren ist.

Die Analyse der Moleküle aus Probe II von TDI / HD zeigt interessante Unterschiede gegenüber Probe I. Obwohl die Temperaturabhängigkeiten von Linienbreite und Position auf den ersten Blick sehr ähnlich erscheinen, konnte kein Datensatz der fünf Moleküle ohne die TLS Beiträge angepasst werden. Zusätzlich konnten die Daten der Linienverschiebung für drei Moleküle gar nicht ausgewertet werden. Sie zeigen keinen klaren Trend im unteren Temperaturbereich, wo die vereinfachten Ausdrücke für die Kopplung an pseudolokale Phononen angewendet werden dürfen. Der wahrscheinlichste Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse für die Proben I und II steht wohl in Zusammenhang mit der Probenpräparation. In Probe I sind wohl noch Reste von Methylenchlorid, die die Stabilität des Chromophors und der langen Hexadecanketten beeinflussen. In Probe II fügen sich der Chromophor und HD nicht perfekt aneinander und verursachen damit freie Volumina und Störungen in der Kristallstruktur von HD. Die Messungen reflektieren diesen Grad an Unordnung in der

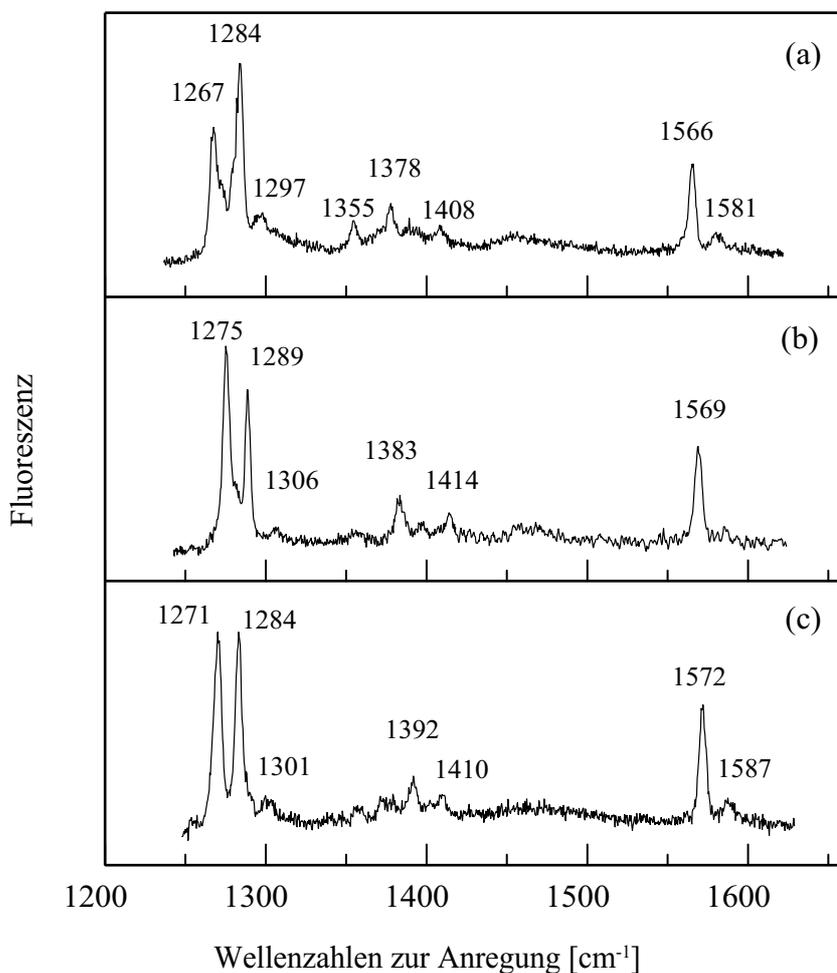


Abbildung 5.11: Fingerprint-Bereich der linienverschmälerten Fluoreszenzspektren einzelner TDI-Moleküle in HD (Probe I) bei 2,5 K, die bei ihrem 0-0 Übergang bei (a) 653,13 nm, (b) 656,72 nm und (c) 660,62 nm angeregt wurden. Die drei stärkeren Moden sind charakteristisch für TDI, können aber durch den individuellen Einbau in absoluter Position und Intensität von Molekül zu Molekül variieren. Sie sind auf der Seite höherer Wellenzahlen begleitet von Phononenpeaks, die als minimale Phononenseitenbanden unter Erzeugung nur eines Phonons beim elektronischen Übergang in ein Schwingungsniveau betrachtet werden können.

Umgebung der Farbstoffmoleküle. In welchem Ausmaß unkontrollierbare Parameter bei der Abkühlung zu unterschiedlichen Probenqualitäten führen können, ist bisher unbekannt. Ist die Unordnung in der Matrix zu groß, gibt es durch starke spektrale Diffusion Probleme bei der Datenanalyse. Die aus Probe II bestimmten Phononenenergien liegen zwischen 18 und 25 cm^{-1} (T_0 : 26-35 K) und sind geringfügig höher als in Probe I. Für die Moleküle A und B in Abb. 5.9 (b) konnte die Phononenlebenszeit zu 5 ps abgeschätzt werden.

In der semikristallinen Wirtsmatrix PE (Abb. 5.10) zeigten sich noch stärkere TLS Beiträge. Dies konnte schon aus dem Vergleich der Linienbreitenverteilungen erwartet werden und ist unter anderem veranschaulicht am uneinheitlichen Verlauf der Linienposition von Molekül A dieser Probe. Entsprechend war es auch schwieriger, eine ausreichende Anzahl von Spektren von einem Molekül zu erhalten, und für die Fälle, in denen dies gelang, zeigen sich starke Unterschiede. Bei Betrachtung der präexponentiellen Faktoren, die den Beitrag der pseudolokalen Phononen repräsentieren, beobachtet man nur kleine Werte, die nahezu vernachlässigt werden können, wenn für α Werte bis zu 2 akzeptiert werden. Die Daten sollten jedoch nicht unter Vernachlässigung des Einflusses pseudolokaler Phononen ausgewertet werden. Entsprechend kann aber kaum eine Aussage über die Phononenenergien gemacht werden, weil der Fehlerbereich zu groß ist. Es zeigten sich auch höhere Tieftemperaturgrenzwerte der Linienbreiten $\Delta\nu_{hb_0}$, die ihrerseits auf stärkere spektrale Diffusion hinweisen, sowie erhöhte Vorfaktoren a_w des Potenzgesetzes für die Verbreiterung. In der Tatsache, dass die Vorfaktoren a_w im Mittel viermal so groß sind wie die entsprechenden Werte in der Probe II von TDI / HD, bestätigen sich wiederum die unterschiedlichen Grade der Unordnung.

Im Vergleich aller drei Proben findet man signifikante Unterschiede, die aus der Wechselwirkung der Chromophore mit den unterschiedlichen Umgebungen resultieren. Die erstmalige Einbeziehung von Volumenexpansion in der Auswertung von Daten temperaturabhängiger Linienverschiebungen von einzelnen Molekülen zeigt, dass dieser Beitrag unverzichtbar ist. Wenn die gewöhnlich unsystematischen Effekte von TLS nicht zu dominant sind, ist es möglich, aus den Messungen der Linienverbreiterung und -verschiebung Eigenschaften wie Energie und Lebenszeit der pseudolokalen Phononen zu entnehmen. Andernfalls kann mit kürzeren Aufnahmezeiten für die Spektren versucht werden, diesem Problem entgegenzuwirken. Mit größerem Aufwand kann versucht werden, mit den exakten Ausdrücken aus der Theorie der pseudolokalen Phononen [119] auch das Verhalten bei höheren Temperaturen, dessen Abweichungen hier außer Acht gelassen werden mussten, zu reproduzieren und damit die Theorie im allgemeineren Fall zu testen.

5.2 Perylen-Terrylendiimid - Modellchromophor für Energietransfer-Untersuchungen

Die Untersuchung von Energietransfer an einzelnen Molekülen in fester Phase erlaubt die Beobachtung des Prozesses für individuelle, fixierte Konformationen und schließt jede Informationsreduzierung durch Mittelungen aus. In Abhängigkeit ver-

schiedener Orientierungen und Abstände von Donor- und Akzeptormolekül kann aus spektralen Eigenschaften die Energietransferrate k_{ET} bestimmt und die Übereinstimmung mit der Theorie des Förster-Mechanismus geprüft werden.

Als Modellsystem wurde ein gekoppelter Bichromophor synthetisiert. Er besteht aus den Farbstoffen Perylen und TDI, die sich beide für Einzelmolekülexperimente bei Tieftemperatur eignen und über eine flexible Kohlenwasserstoffkette C_6H_{12} kovalent, aber flexibel miteinander verbunden sind. Perylen stellt in diesem System den Donor dar, der nach Anregung entweder selbst fluoresziert oder strahlungslos Energie an den Akzeptor TDI überträgt, so dass dieser fluoresziert. Bevor auf die Methoden, die spektralen Eigenschaften des Bichromophors Pe-TDI und die Experimente eingegangen wird, soll ein kurzer Überblick über die Theorie des Energietransfers gegeben werden [160, 161, 162].

5.2.1 Grundlagen des elektronischen Energietransfers nach dem Förster-Mechanismus

Die Übertragung von elektronischer Anregungsenergie kann in Gasen, in Lösungen und auch im Festkörper stattfinden. Dabei besteht kein prinzipieller Unterschied, ob der Energieübergang zwischen separierten Teilchen z.B. in Lösung auftritt (intermolekular) oder zwischen zwei getrennten Gruppen eines Moleküls (intramolekular) [162]. Untersuchungen zum zwischenmolekularen Energieübergang wurden schon zu Beginn der 20er Jahre unternommen. Ein historischer Überblick ist in [163] und [164] gegeben. Der hier interessierende Fall des Festkörpers erlaubt keine Diffusion und keine Orientierungsänderungen der Moleküle. Die Moleküle haben einen konstanten Abstand und eine ortsfeste Lage, so dass Wechselwirkungen durch Kollisionen ausscheiden.

Für die Energieübertragung von einem angeregten Molekül, dem Donor (D), zu einem anderen Molekül, dem Akzeptor (A), lassen sich zwei Prozesse unterscheiden:

- strahlende Energieübertragung: zwischen Donor und Akzeptor tritt keine direkte Wechselwirkung auf, sondern der Transport geschieht über die Emission und Reabsorption eines Photons (trivialer Prozess).
- strahlungslose Energieübertragung: durch Coulombsche und Austauschwechselwirkung während der Anregungslebenszeit des Donormoleküls kann Energie ohne Beteiligung eines Photons übertragen werden.

Es gibt einige Unterscheidungskriterien zwischen beiden Prozessen [163]. Dazu zählt das Fluoreszenzspektrum, das beim strahlungslosen Prozess unverändert bleibt,

beim trivialen Prozess aber entsprechend dem Absorptionsspektrum des Akzeptors abgeschwächt wird, und die Donorlebenszeit, die durch den strahlungslosen Prozess als zusätzlichem Relaxationskanal gekürzt wird, beim trivialen Prozess aber nicht verändert wird.

Im Folgenden soll primär der strahlungslose Prozess betrachtet werden. Das Donormolekül absorbiert ein Photon und gelangt in den angeregten Singulett-Zustand S_1 (D^*). Bevor es strahlend relaxiert, soll es die elektronische Anregungsenergie ohne Beteiligung eines Photons an das Akzeptormolekül übertragen. Dieses gelangt entsprechend in den Singulett-Zustand S_1 (A^*). Übergänge, an denen ein Triplettzustand beteiligt ist, sind sehr unwahrscheinlich und werden hier nicht betrachtet.



Die Übergangsrate

Die Coulombsche Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor führt zu einer Störung der Zustände von D^* und A , der zugehörige Hamilton Operator sei mit H^{WW} bezeichnet. Mit der zeitabhängigen Störungsrechnung lässt sich die Rate k_{mn} aus dem Anfangszustand $|m\rangle$ in den Zustand $|n\rangle$ berechnen [165] :

$$k_{mn} = \frac{2\pi}{\hbar} \delta(E_n - E_m) |\langle n|H^{WW}|m\rangle|^2 \quad (5.6)$$

Die Diracsche δ -Funktion in Gl. 5.6 fordert die Übereinstimmung beider Energien. Bei aromatischen Farbstoffmolekülen sind die elektronischen Zustände durch die Schwingungsfeinstruktur vielfach unterteilt. Die Energie, die der Akzeptor aufnehmen kann, gleicht also einem quasikontinuierlichen Spektrum. Für die Endzustände $|f\rangle$ (*final*) lässt sich die Zustandsdichte $\rho_A(E)$ definieren als Zahl der Zustände pro Energieintervall ΔE_f . Die Gesamtrate erhält man durch Summation von Gleichung 5.6 über alle Endzustände, d.h. durch Integration über alle Energien nach Multiplikation mit der Zustandsdichte. Das Ergebnis ist Fermis Goldene Regel. Da auch die Anfangszustände $|i\rangle$ (*initial*) als kontinuierlich betrachtet werden können (die zugehörigen Energien treten im Übergang des Donors vom Schwingungsgrundzustand von S_1 in die vielen Schwingungsniveaus von S_0 und zusätzlicher Matrixphononanregung auf; siehe Abb. 5.12 a), kann man einen Schritt weiter gehen und auch hier eine Zustandsdichte $\rho_D(E)$ einführen, die beim Integrieren als Verteilungsfunktion

dient (letztendlich stecken in den abstrakt klingenden Verteilungen vor allem die Spektren der beiden Moleküle). Die Gleichung für die Rate lautet damit:

$$k_{DA} = \frac{2\pi}{\hbar} \int dE \rho_D(E) \rho_A(E) |\langle f | H^{WW} | i \rangle|^2 \quad (5.7)$$

Anfangs- und Endzustand lassen sich durch die normierten und orthogonalen Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor in Grund- und angeregtem (*) Zustand darstellen. Die allgemeine Behandlung fordert die Antisymmetrisierung der Wellenfunktionen aufgrund des Pauli-Prinzips. Zwei Elektronen sind an den Anregungen beteiligt, die entsprechende Zahl ist der Wellenfunktion als Index zugeordnet.

$$|i\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(|D_{(1)}^* A_{(2)}\rangle - |D_{(2)}^* A_{(1)}\rangle \right) \quad (5.8)$$

$$|f\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(|D_{(1)} A_{(2)}^*\rangle - |D_{(2)} A_{(1)}^*\rangle \right) \quad (5.9)$$

Das Übergangsmatrixelement $\langle H_{DA}^{WW} \rangle := \langle f | H^{WW} | i \rangle$ zerfällt dann in zwei Teile:

$$\langle H_{DA}^{WW} \rangle = \underbrace{\langle D_{(1)} A_{(2)}^* | H^{WW} | D_{(1)}^* A_{(2)} \rangle}_{\rightarrow \text{„Förster“}} + \underbrace{\langle D_{(1)} A_{(2)}^* | H^{WW} | D_{(2)}^* A_{(1)} \rangle}_{\rightarrow \text{„Dexter“}} \quad (5.10)$$

Der erste Term ist die Coulomb-Wechselwirkung, die im Rahmen der Förster-Theorie im Folgenden behandelt wird. Der zweite Term ist die Austausch-Wechselwirkung, die zum Dexter-Mechanismus führt [166]. Der Austauschterm tritt nur als Folge der Antisymmetrisierung auf und ist damit eine rein quantenmechanische Erscheinung. Er verschwindet, wenn die Wellenfunktionen nicht überlappen, da das Pauli-Prinzip dann nicht angewendet werden muss. Durch die notwendige Überlappung der Ladungswolken ist der Dexter-Mechanismus sehr kurzreichweitig und wirkt sich nur bei Molekülabständen R bis maximal 10 Å aus [167].

Dipol-Dipol-Wechselwirkung

Der erste Term in Gleichung 5.10 stellt die Coulombsche Wechselwirkung zwischen den Ladungsverteilungen der elektronischen Übergänge beider Moleküle dar. Sie lässt sich in Multipolen entwickeln. Da die Moleküle neutral sind, verschwinden die Monopolterme und als niedrigste Ordnung tritt die elektrische Dipol-Dipol-Wechselwirkung H^{dd} auf:

$$H_{Coul.}^{WW} = H^{dd} + \underbrace{H^{dq} + \dots}_{\text{höhere Ordnungen}} \quad (5.11)$$

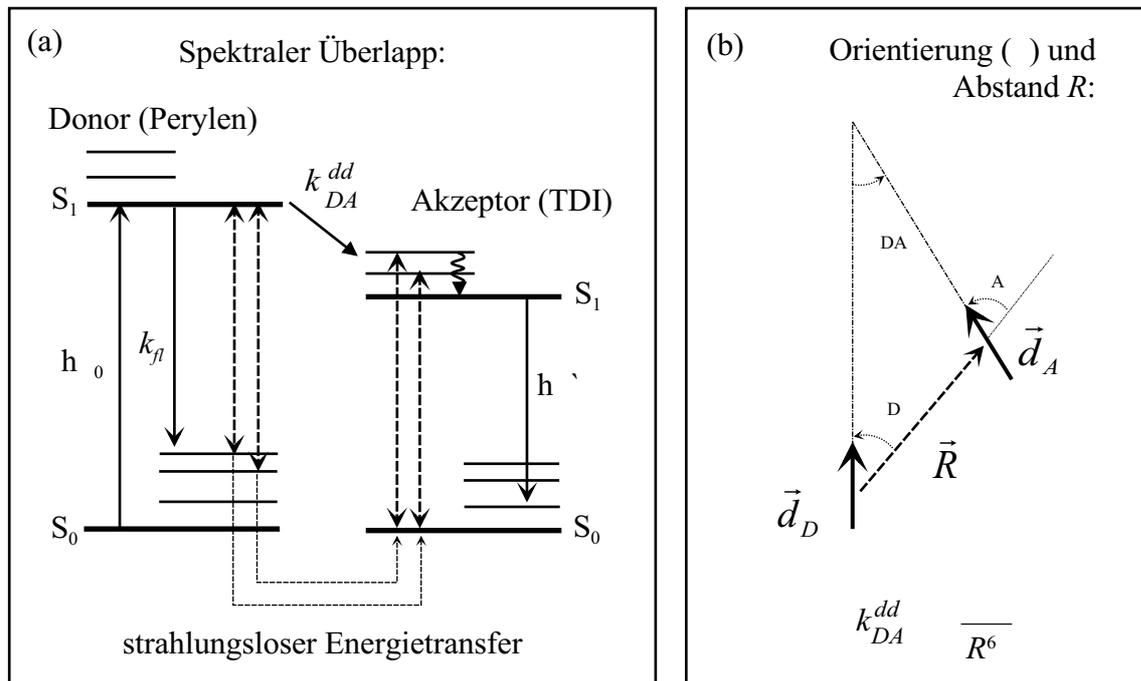


Abbildung 5.12: (a) Niveauschema zum Energietransfer. Nach Anregung des Donors kann dieser entweder selbst fluoreszieren oder strahlungslos seine Anregungsenergie an den Akzeptor übertragen, woraufhin dieser fluoresziert (strahlungslose Relaxationen werden als vernachlässigbar angenommen). Wegen der Energieerhaltung muss der Akzeptor genau die vom Donor abgegebene Energie (unter Beachtung von Schwingungsanregungen) aufnehmen. Anschaulich entspricht das dem Überlapp des Fluoreszenzspektrums des Donors D und des Absorptionsspektrums des Akzeptors A . (b) Relative Orientierung der beiden Dipole im Nahfeld. Die Energietransferrate k_{DA}^{dd} hängt quadratisch vom Orientierungsfaktor κ (Gl. 5.13) und invers von der sechsten Potenz des Abstands R der Dipole ab.

Die höheren Ordnungen wie die elektrische Dipol-Quadrupol-Wechselwirkung und andere Kombinationen von elektrischen und magnetischen Multipolmomenten können gegenüber dem führenden Term vernachlässigt werden (sie werden zum Teil in [166] und [168] behandelt). In dieser Näherung soll nun die Energieübertragung durch Wechselwirkung zweier Dipole stattfinden, also zwischen den Übergangsdipolmomenten der Moleküle. Wie schon in Kap. 2.4.2 erwähnt, unterscheidet die Elektrodynamik für das Feld eines Dipols [98] zwei Fälle für große und kleine Dipolabstände R . Im Fernfeld ($kR \gg 1$, wobei $k = \omega/c = 2\pi/\lambda$ der Betrag des Wellenvektors ist) erhält man das bekannte Strahlungsfeld eines Hertzschen Dipols. Bei optischen Übergängen ist diese Bedingung für Abstände R größer als etwa 500 nm erfüllt. Hier kann der triviale Prozess der Reabsorption auftreten, der hier nicht weiter behandelt werden soll.

Im Nahfeld ($kR \ll 1$) kann der Akzeptor direkt mit dem Donor wechselwirken. Dieser strahlungslose Fall tritt bei optischen Übergängen für Abstände R kleiner als etwa 100 \AA auf. Die Stärke der Wechselwirkung kann anschaulich mit Hilfe der Feldlinien des Donordipols abgeschätzt werden. Die Wechselwirkungsenergie zwischen den beiden Dipolen \vec{d}_D (im Ursprung) und \vec{d}_A (am Ort \vec{R}) ist durch die folgende Gleichung gegeben (im cgs-Einheitensystem; \vec{R}^0 ist der Einheitsvektor von \vec{R} , n ist der Brechungsindex des umgebenden Mediums, wobei $n^2 = \epsilon_r$ die Dielektrizitätskonstante ist; vgl. auch Gl. 2.21):

$$H^{dd} = \frac{3 (\vec{R}^0 \vec{d}_D) (\vec{R}^0 \vec{d}_A) - \vec{d}_D \vec{d}_A}{n^2 R^3} = \frac{d_D d_A \kappa}{n^2 R^3} \quad (5.12)$$

$$\kappa = 3 \cos \varphi_D \cos \varphi_A - \cos \varphi_{DA} \quad (5.13)$$

Die Winkelbezeichnungen ergeben sich aus der Notation bzw. aus Abb. 5.12 (b).

Förster-Theorie des dipolaren Energietransfers

Für große Moleküle ist die Abstandsdefinition etwas unscharf. Eigentlich geht man von punktförmigen Teilchen aus. Ist die Molekülausdehnung geringer als der Abstand, lassen sich noch die Schwerpunkte zu Hilfe nehmen. Sind beide von der gleichen Größenordnung, gelangt man in einen Bereich, für den keine klaren Abstandsangaben mehr möglich sind und in dem der Dexter-Mechanismus an Bedeutung gewinnt.

Die Förster-Theorie beschreibt die Energieübertragung zwischen räumlich getrennten Molekülen durch die eben dargestellte strahlungslose Dipol-Dipol-Wechselwirkung und behandelt damit Molekülabstände zwischen etwa 10 und 100 \AA . Die Verwendung von Gln. 5.7 und 5.12 liefert die Rate:

$$\begin{aligned} k_{DA}^{dd} &= \frac{2\pi}{\hbar} \int dE \rho_D(E) \rho_A(E) \frac{d_D^2 d_A^2 \kappa^2}{n^4 R^6} \\ &= \frac{2\pi}{\hbar} \frac{\kappa^2}{n^4 R^6} \frac{1}{hc} \int d\bar{\nu} d_D^2 d_A^2 \rho_D(\bar{\nu}) \rho_A(\bar{\nu}) \end{aligned} \quad (5.14)$$

Die Dipole sind die Übergangsdipolmomente d der Moleküle, die durch die geänderte Ladungsverteilung im angeregten Zustand entstehen. In der zweiten Zeile wurde die Integration über die Energie auf die üblicheren Wellenzahlen $\bar{\nu}$ umgerechnet.

Es zeigt sich jetzt schon die Abstandsabhängigkeit, nämlich zu R^{-6} , sowie die Abhängigkeit der Rate von der gegenseitigen Orientierung durch κ^2 (definiert in Gl. 5.13). Der Winkelfaktor κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Bei Brownscher Bewegung bzw. Rotationsdiffusion (in Lösungen und Gasen) ergibt sich ein Mittelwert $\bar{\kappa}^2$ von $\frac{2}{3}$. Für statistisch verteilte Vektoren ergibt sich im Mittel $\bar{\kappa}^2 = 0,476$ [161].

Die Faktoren unter dem Integral lassen sich durch spektroskopisch messbare Größen darstellen [169], nämlich im Wesentlichen durch das Fluoreszenzspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors. Das Fluoreszenzspektrum $f_D^0(\bar{\nu})$ sei normiert ($\int d\bar{\nu} f_D^0(\bar{\nu}) = 1$), $\varepsilon_A(\bar{\nu})$ entspricht dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und ist der molare, dekadische Extinktionskoeffizient, der aus dem Lambert-Beerschen Gesetz $I(x) = I_0 10^{-\varepsilon_A c x}$ bekannt ist. Weitere benötigte Größen sind die mittlere Lebensdauer τ_0 des ungestörten angeregten Zustandes des Donormoleküls, die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f in Abwesenheit eines Akzeptors, sowie die Avogadro-Konstante N_A . Damit lässt sich k_{DA}^{dd} in der üblichen Weise darstellen:

$$k_{DA}^{dd} = \frac{9 (\ln 10) \phi_f}{128 \pi^5 n^4 N_A} \frac{1}{\tau_0} \frac{\kappa^2}{R^6} \int f_D^0(\bar{\nu}) \varepsilon_A(\bar{\nu}) \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \quad (5.15)$$

Eine übersichtlichere Darstellung liefert die Einführung des Försterradius R_0 :

$$k_{DA}^{dd} = \frac{1}{\tau_0} \frac{R_0^6}{R^6} \quad (5.16)$$

$$R_0^6 = \frac{9 (\ln 10) \phi_f}{128 \pi^5 n^4 N_A} \kappa^2 \int f_D^0(\bar{\nu}) \varepsilon_A(\bar{\nu}) \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \quad (5.17)$$

Der Försterradius R_0 ist der Abstand, bei dem die Rate für den Förster-Energietransfer k_{DA}^{dd} und die natürliche Rate des strahlenden Prozesses $k_f = 1/\tau_0$ übereinstimmen. Voraussetzung für das Auftreten des Förster-Mechanismus ist neben einer Orientierung mit $\kappa \neq 0$ der Überlapp von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum (bei der Temperatur, bei der auch der Energietransfer stattfinden soll). Die Theorie zum Energietransfer durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung wurde von Förster zunächst klassisch hergeleitet [170] und später quantenmechanisch ausgearbeitet [166, 169, 171].

5.2.2 Methoden zur Bestimmung der Energietransferrate

Das Ziel der Untersuchungen war die Bestimmung der individuellen Energietransferraten k_{ET} (im Rahmen der Herleitung der Förster-Theorie wurde k_{ET} mit k_{DA}^{dd} bezeichnet) einzelner Moleküle im Festkörper in ihrer starren Konformation. Die relative Orientierung der Moleküle kann durch Polarisationsexperimente mit Einschränkungen bestimmt werden. Bei tiefen Temperaturen muss das Donormolekül zunächst in Form seines Fluoreszenzanregungsspektrums isoliert werden. Zur Bestimmung von k_{ET} sind zwei verschiedene Methoden denkbar: die Bestimmung der Linienbreite, um aus der Verbreiterung die Rate für den Energietransferprozess k_{ET} zu ermitteln, oder die selektive Bestimmung des Anteils an Pe- und TDI-Fluoreszenz, um aus dem Verhältnis Rückschlüsse auf k_{ET} zu ziehen.

Die Linienbreite des Anregungsspektrums eines einzelnen Moleküls ist gegeben durch die Summe aller Zerfallsraten des angeregten Zustands:

$$\Delta\omega_{hb} = \frac{1}{\tau} = k_{\text{ges}} = k_f + k_{ET} \quad (5.18)$$

Strahlungslose Relaxationsprozesse wie Interkombination und interne Konversion seien vernachlässigt, da es aus Lebensdauermessungen keine Hinweise darauf gibt. Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f wird entsprechend als näherungsweise 1 angenommen. Die Fluoreszenzrate k_f von Pe ist $1/\tau_0$ mit der Lebenszeit τ_0 in Abwesenheit des Akzeptors. Der Energietransferprozess verbreitert nach 5.18 die Absorptionslinie. Um die Messdaten auswerten zu können, muss eine Matrix gewählt werden, in der TLS Beiträge nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Tritt Energietransfer auf, sollte man Fluoreszenz von Pe und auch von TDI sehen und deshalb Anregungsspektren derselben Pe-Absorptionslinie aufnehmen können bei spektral selektierter Detektion von einerseits Pe-Fluoreszenz und andererseits TDI-Fluoreszenz. Aus den integralen Intensitäten I_{Pe} und I_{TDI} (korrigiert um die Detektionseffizienzen) kann die Quantenausbeute ϕ_{ET} des Energietransfers bestimmt werden (wieder unter der Annahme, dass keine weiteren strahlungslosen Relaxationskanäle existieren). Mit der Fluoreszenzrate k_f kann man damit auch die Energietransferrate k_{ET} berechnen:

$$\phi_{ET} = \frac{I_{\text{TDI}}}{I_{\text{Pe}} + I_{\text{TDI}}} = \frac{k_{ET}}{k_f + k_{ET}} \quad (5.19)$$

Die Energietransferrate k_{ET} kann unter den experimentellen Bedingungen nur für einen eingeschränkten Wertebereich bestimmt werden. Um genügend Signal der TDI Fluoreszenz detektieren zu können, darf k_{ET} nicht beliebig klein sein. Außerdem

darf k_{ET} nicht beliebig groß sein, da das durch die zugehörige Verbreiterung abnehmende Signal-zu-Untergrund Verhältnis ab einem bestimmten Wert keine Pe-Absorptionslinie mehr erkennen lässt. Als Abschätzung lässt sich folgende Forderung angeben:

$$0,2 k_f < k_{ET} < 2 k_f \quad (5.20)$$

5.2.3 Spektrale Eigenschaften von Pe-TDI

In Abb. 5.13 sind das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Pe-TDI in Methylenchlorid CH_2Cl_2 dargestellt. Das Absorptionsspektrum in Chloroform CHCl_3 zeigt innerhalb der Fehlergrenzen keine Änderung. Im Absorptionsspektrum kann man feststellen, dass das gekoppelte System im Wesentlichen unverändert die Absorptionsspektren von Perylen und von TDI in Überlagerung zeigt. Im blauen Spektralbereich ist das Spektrum des Pe-Teils mit Absorptionsmaximum bei 451 nm und im Roten ist die Bande von TDI mit Maximum bei 660 nm sichtbar. Die überbrückende Kohlenwasserstoffkette und weitere Seitengruppen, die zur Synthese notwendig sind, führen nur zu einer leichten Verschiebung der Banden. Zum Vergleich wurde das Absorptionsmaximum von reinem Perylen in Methylenchlorid zu 437 nm und von TDI (ohne Seitengruppen) in Methylenchlorid zu 650 nm bestimmt. Das Absorptionsspektrum lässt den Schluss zu, dass keine Überlappung oder größere Veränderung der beiden konjugierten π -Systeme als Folge der kovalenten Verknüpfung auftritt.

Auch im Fluoreszenzspektrum erscheinen die Beiträge der beiden verbundenen Chromophore spektral getrennt voneinander. Die Maxima in der Fluoreszenz sind gegenüber den Absorptionsmaxima auf 470 und 705 nm verschoben. Die Bande bei 556 nm ist nicht typisch für Perylen, ihr Ursprung konnte jedoch nicht sicher geklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Exciplex (*Excited State Complex*) [161], das durch Kopplung des angeregten Perylens mit TDI unter Umständen in einer sandwichartigen Konformation auftritt.

Das Absorptionsspektrum der TDI-Untereinheit (im restlichen Unterkapitel nur noch mit TDI bezeichnet) überlappt mit der Emission des angekoppelten Perylens (Pe), womit Energietransfer möglich ist. Außerdem tritt keine direkte Anregung von TDI bei Anregung von Pe im Maximum um 450 nm auf, weil die Spektren zueinander sehr weit verschoben sind. Dies wurde durch Testmessungen bestätigt.

Anhand des Fluoreszenzspektrums in Abb. 5.13 (b) lässt sich feststellen, dass unter den gegebenen Bedingungen in der CH_2Cl_2 -Lösung die mittlere Energietransferrate k_{ET} in der Größenordnung der Fluoreszenzrate k_f ist, da die Banden von Pe und

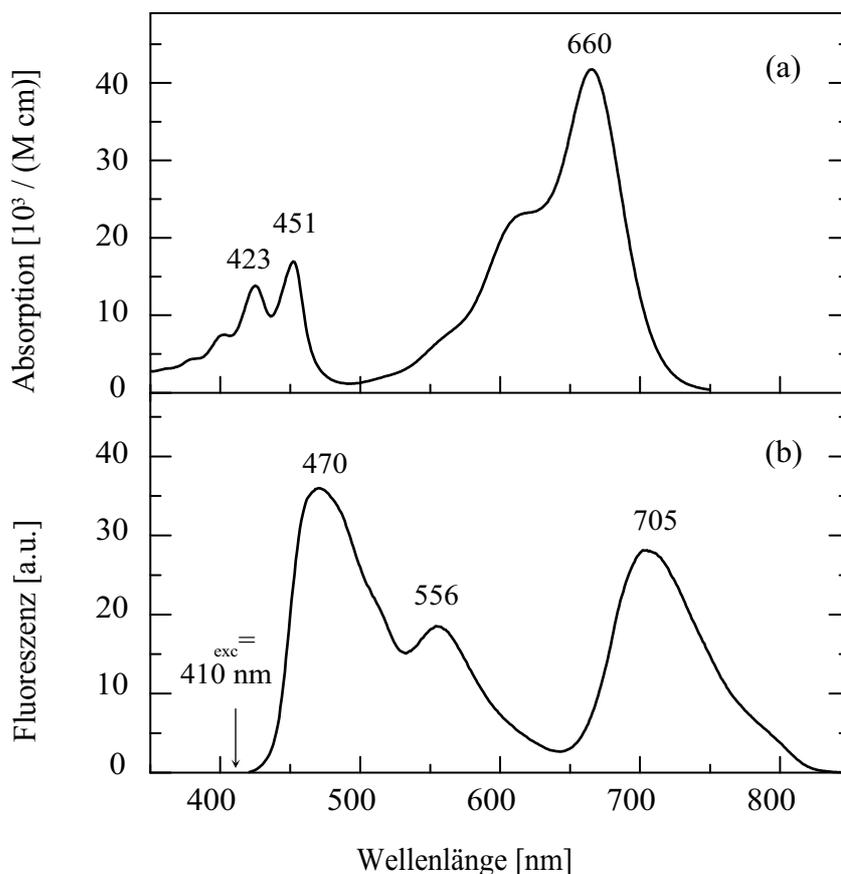


Abbildung 5.13: (a) Absorptions- und (b) Fluoreszenzspektrum von Pe-TDI in einer Methylchlorid-Lösung bei Raumtemperatur. Der Fehler beträgt ± 5 nm.

TDI ähnlich intensiv sind. Eine genaue quantitative Bestimmung führt zu einer Quantenausbeute ϕ_{ET} für den Energietransfer von ~ 40 % bzw. zu einer mittleren Energietransferrate k_{ET} von $\sim 0,7 k_f$, die im gewünschten Bereich liegt.

Um den Einfluss einer festen Matrix, in der im Gegensatz zur Lösung keine Reorientierungen möglich sind, sowie den Einfluss der Temperatur auf das Fluoreszenzverhalten einschätzen zu können, wurden Fluoreszenzspektren von Pe-TDI eingelagert in Polyethylen (PE) und Tetradecan (TD) bei $T = 2$ K aufgenommen (Abb. 5.14). Die Spektren sind schmalbandig im Bereich der Pe-Fluoreszenz, da Pe durch den Laser innerhalb der inhomogenen Verbreiterung selektiv angeregt wird. Auch die Seitenbande der Perylenfluoreszenz, die in Tetradecan um 573 nm auftritt (Abb. 5.14 b), zeigt Linienverschmälerung und muss deshalb den selektierten Pe-Molekülen zugeordnet werden. Die TDI-Fluoreszenz ist erwartungsgemäß breitbandig, da mit dem Energietransfer keine Selektion innerhalb der inhomogen verbreiterten TDI-Absorptionsbande verbunden ist. Diese Spektren decken sehr unter-

schiedliche Veränderungen der Quantenausbeute ϕ_{ET} im Vergleich mit den Spektren der Lösung auf.

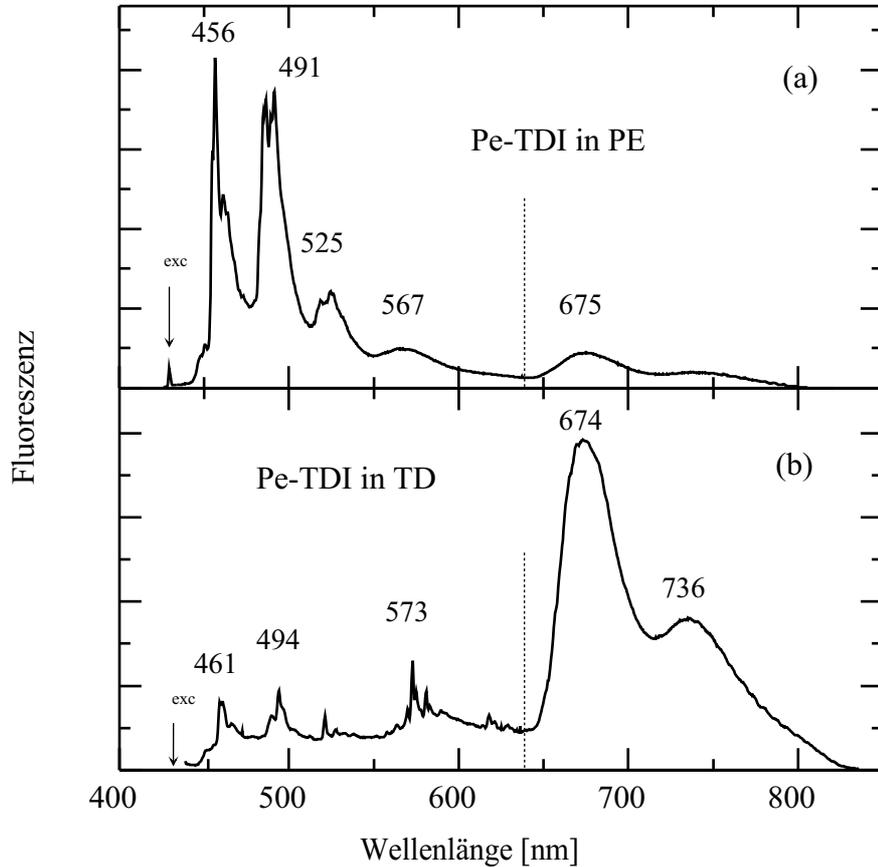


Abbildung 5.14: Fluoreszenzspektren von Pe-TDI in (a) Polyethylen ($\lambda_{exc} = 430,2$ nm) und (b) Tetradecan ($\lambda_{exc} = 432,9$ nm) bei 2 K. Die beiden Matrizen zeigen einen stark unterschiedlichen Einfluss auf die Quantenausbeute für den Energietransfer mit (a) $\phi_{ET} = 16$ % und (b) $\phi_{ET} = 73$ %.

Die starke Erniedrigung der Quantenausbeute für den Energietransfer in der PE Matrix auf $\phi_{ET} = 16$ % lässt sich durch die Linienverschmälerung bei tiefen Temperaturen erklären. Diese führt zu einer Reduzierung des spektralen Überlapps und damit zu einer Abnahme der Energietransferrate k_{ET} . Die anderen entscheidenden Parameter wie Orientierung (κ) und mittlerer Abstand R sollten sich in der ungeordneten Matrix und durch die kovalente Bindung nicht stark von der Situation in Lösung unterscheiden.

Für die starke Erhöhung der Quantenausbeute für den Energietransfer in TD auf $\phi_{ET} = 73$ % muss eine Orientierung der Moleküle in der polykristallinen Matrix als Ursache herangezogen werden. Die Linienverschmälerung infolge der Temperaturer-

niedrigung sollte auch in dieser Matrix die Tendenz zu geringerem Energietransfer zeigen. Auch der Abstand R sollte aufgrund der kovalenten Anbindung beider Chromophore nicht deutlich anders sein. In Falle einer linearen Anordnung der Moleküle würde der Orientierungsfaktor κ^2 statt dem Mittelwert von $\frac{2}{3}$ seinen Maximalwert von 4 erreichen und den verstärkten Energietransfer erklären.

5.2.4 Der Försterradius

Bevor auf einzelne Experimente eingegangen wird, ist es sinnvoll, den in der Förstertheorie charakteristischen Abstand R_0 , den Försterradius, nach Gl. 5.17 zu bestimmen. Försterradien liegen üblicherweise im Bereich zwischen 20 und 80 Å.

Die Berechnung des Bruches in Gl. 5.17 liefert für einen Brechungsindex n von 1,5 (für PE) den Wert $1,7 \times 10^{-28}$ mol. Zur Berechnung des Integrals in Gl. 5.17 wurden das Fluoreszenzspektrum von isoliertem Pe und das Absorptionsspektrum von isoliertem TDI bei Raumtemperatur aufgenommen (s. Abb. 5.15). Das Maximum des

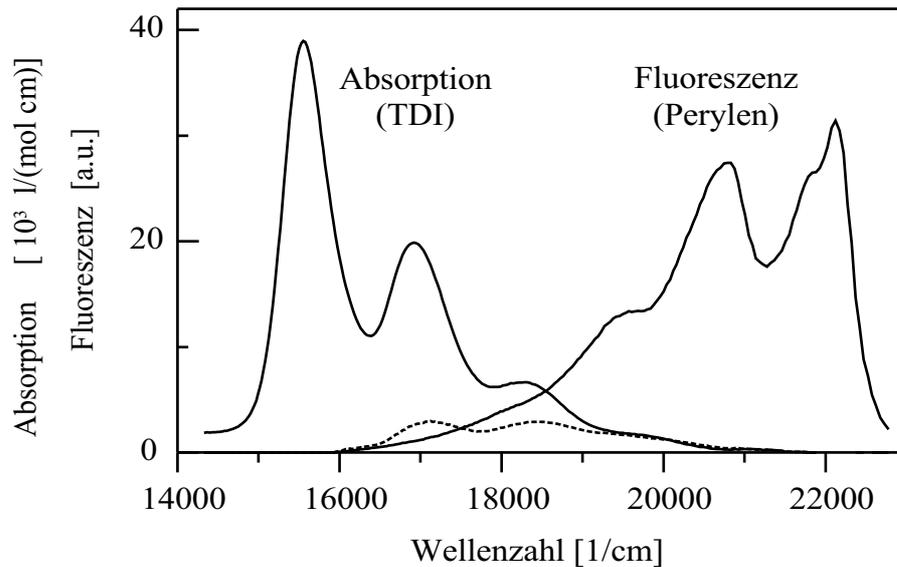


Abbildung 5.15: Fluoreszenzspektrum von Pe und Absorptionsspektrum von TDI (in CH_2Cl_2) zur Berechnung des Försterradius R_0 . Die gestrichelte Linie zeigt den Integranden $\varepsilon_{\text{TDI}}(\bar{\nu}) f_{\text{Pe}}(\bar{\nu})/\bar{\nu}^4$ ($\times 10^{10}$) und damit den spektralen Überlapp.

Absorptionsspektrums von TDI bei 15550 cm^{-1} ($\cong 643 \text{ nm}$) wurde skaliert auf $\varepsilon_{\text{max}} = 39\,000 \text{ l}/(\text{mol cm})$. Das Fluoreszenzspektrum von Perylen wird in der Rechnung normiert. Die Integration wird durch entsprechende Summation über die diskreten Messpunkte durchgeführt. Für den integralen Ausdruck in Gl. 5.17 erhält man

$(\int \varepsilon_{\text{TDI}}(\bar{\nu}) f_{\text{Pe}}(\bar{\nu})/\bar{\nu}^4 d\bar{\nu}) / (\int f_{\text{Pe}}(\bar{\nu}) d\bar{\nu}) = 1,1 \times 10^{-14} \text{ l cm}^3/\text{mol}$. Mit dem Faktor κ^2 , der im Lösung als $\frac{2}{3}$ angenommen wird, erhält man für R_0 :

$$R_0(\text{Pe} \rightarrow \text{TDI}) = 33 \text{ \AA} \quad \text{für } \kappa^2 = \frac{2}{3} \quad \text{bei Raumtemperatur} \quad (5.21)$$

Zum Vergleich wurde R_0 auch aus den entsprechenden Ausschnitten der Spektren von Pe-TDI (Abb. 5.13) berechnet, wobei sich ein geringfügig höherer Wert ergab. Der Fehler wurde auf $\pm 5 \text{ \AA}$ geschätzt. Zur weiteren Kontrolle wurde dieselbe Rechnung auch für das System $\text{Pe} \rightarrow \text{Pe}$ durchgeführt. Dafür ist ein Literaturwert bekannt [164], der mit dem eigenen Ergebnis von $R_0(\text{Pe} \rightarrow \text{Pe}) = 38 \text{ \AA}$ für $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ übereinstimmt.

Der Abstand der Schwerpunkte der beiden Chromophore im Pe-TDI kann unter Annahme einer C-C Bindungslänge von $1,5 \text{ \AA}$ maximal einen Wert von 20 \AA erreichen (Abb. 5.16 a). Damit ist dieser tatsächlich auftretende Abstand des Zentrums von TDI von dem von Pe aber deutlich kleiner als der berechnete Försterradius R_0 und lässt eine Quantenausbeute für den Energietransfer ϕ_{ET} von über 95 % (für $\kappa^2 = \frac{2}{3}$) erwarten, die stark vom Wert $\phi_{ET} = 40 \text{ \%}$ aus dem Lösungsspektrum in Abb. 5.13 (b) abweicht.

Die Erklärung für diese Abweichung muss durch eine Überprüfung aller Annahmen und die Kontrolle sämtlicher Einflussfaktoren gefunden werden.

Eine falsche Berechnung des spektralen Überlapps kann aufgrund der Kontrollrechnungen zur Klärung ausgeschlossen werden. Zudem ist zu beachten, dass Fehler in Gl. 5.17 sich nur mit der sechsten Wurzel auf den Wert des Försterradius R_0 auswirken. Um R_0 zu halbieren, müssten die Faktoren in Gl. 5.17 um den Faktor 64 kleiner sein.

Für der Parameter n , der die abschirmende Wirkung des Lösungsmittels einbezieht, wurde im Einklang mit der Literatur der Brechungsindex verwendet. In der Herleitung in Gl. 5.12 tritt zwar statt n^2 eigentlich die Dielektrizitätskonstante ε_r (Permittivitätszahl) auf, da es sich beim angeregten Molekül nicht um einen statischen Dipol, sondern einen mit optischen Frequenzen (10^{15} Hz) schwingenden Dipol handelt, ist die Verwendung von n^2 als Grenzwert von ε_r für Feldänderungen hoher Frequenzen gerechtfertigt.

Eine Erklärung der Abweichung könnte im Orientierungsfaktor κ^2 liegen, da durch die Verkettung wohl nicht von statistischer Orientierung und Bewegungsmöglichkeit ausgegangen werden kann. Allerdings müssten auch hier bevorzugt Orientierungen auftreten, die zu äußerst kleinen Werten von κ^2 führen, und zwar in der Größenordnung von 0,01, damit allein durch diesen Effekt R_0 auf etwa 18 \AA reduziert würde.

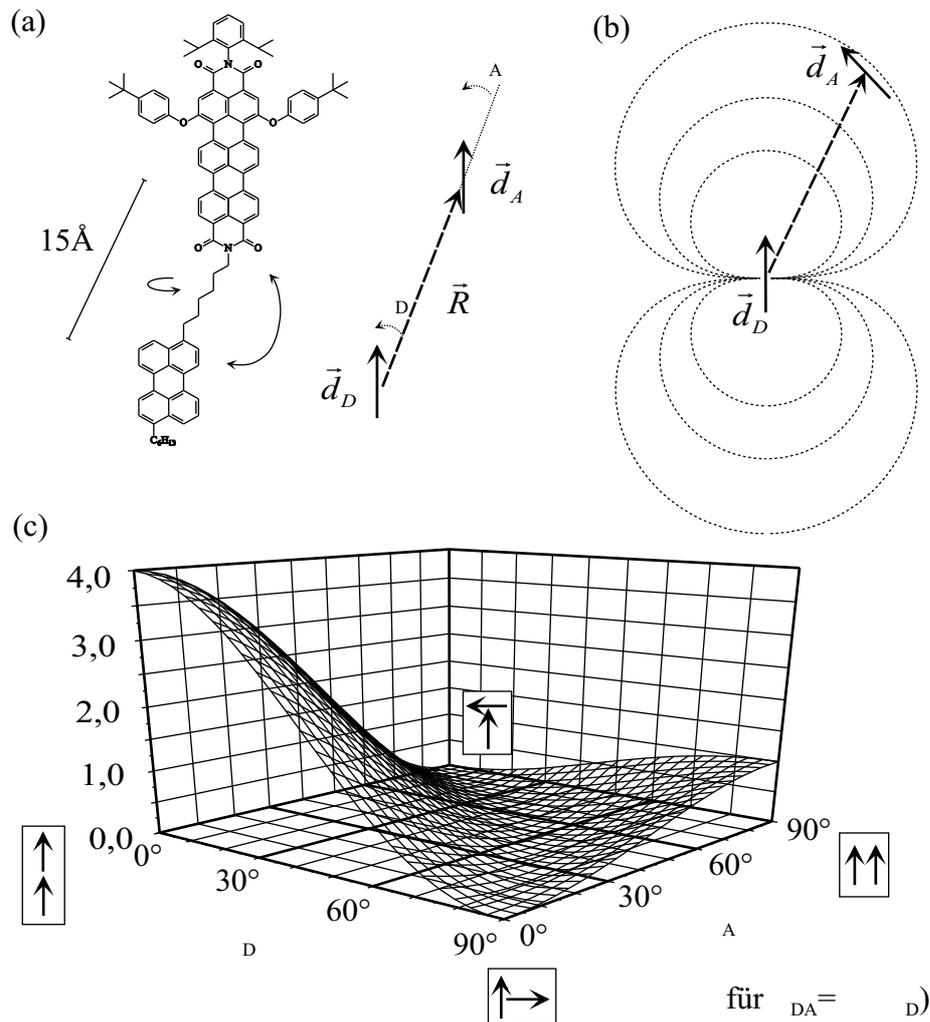


Abbildung 5.16: (a) Strukturformel von Pe-TDI mit zugehöriger Orientierung der Dipole. (b) Äquipotentialflächen des Donordipols. Für die eingezeichnete Orientierung des Akzeptordipols tritt kein Energietransfer auf, da $\kappa = 0$ ist. (c) Werte des Orientierungsfaktors κ^2 in Abhängigkeit der Winkel φ_D und φ_A . Sind beide Werte 0° , so erreicht κ^2 seinen Maximalwert von 4. Daneben gibt es einen Bereich, in dem κ^2 sehr klein oder Null wird. Für die 4 Ecken sind zusätzlich die zugehörigen Konformationen skizziert.

Der Orientierungsfaktor und damit die Energietransferrate werden Null, wenn die Richtung des Akzeptordipols parallel zu den Äquipotentialflächen des Donordipols liegt (Abb. 5.16 b), bzw. wenn sie senkrecht zu den entsprechenden Feldlinien liegt. Da die Übergangsdipolmomente entlang der langen Molekülachse liegen, sind solche relativen Orientierungen bei dem flexiblen Linker durchaus möglich, ob sie aber bevorzugt auftreten, ist fraglich und natürlich von der Matrix abhängig. Unter der Annahme, dass beide Dipole in einer Ebene liegen und damit $\varphi_{DA} = \varphi_A - \varphi_D$ ist,

wurde κ^2 in Abhängigkeit der Winkel φ_D und φ_A berechnet. Das Ergebnis ist in Abb. 5.16 (c) dargestellt (aus Gründen der Übersichtlichkeit nur für $0 < \varphi_A, \varphi_D < 90^\circ$; für die anderen Bereiche sieht der Graph entsprechend aus). Die Bedingung an die beiden Winkel für ein Verschwinden des Energietransfers ist im gegebenen Fall durch $\cos \varphi_A = \sin \varphi_D / \sqrt{1 + 3 \cos^2 \varphi_D}$ festgelegt. Es treten einige mögliche Orientierungen mit vernachlässigbarem Energietransfer auf, eine quantitative Aussage ist jedoch aus diesen Berechnungen nicht möglich.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Erklärung der kleinen beobachteten Transferraten sind zusätzlich auftretende Prozesse. Dazu zählt photoinduzierter Elektronentransfer [172, 173], der thermodynamisch möglich ist, da die freie Enthalpie $\Delta G = E_{Ox}^D - E_{red}^A - E_D^* < 0$ ist ($E_{Ox}^{Pe} = 0,78$ eV, $E_{red}^{TDI} = -0,99$ eV, $E_{Pe}^* = 2,75$ eV) [174]. Eine effektive Reduzierung der Fluoreszenzausbeute und damit Hinweise auf einen derartigen Effekt wurden aber nicht festgestellt. Unter Umständen dürfen auch strahlungslose innere Konversionen im gekoppelten System nicht vernachlässigt werden. Strahlungslose Übergänge von Pe lassen die Energietransferrate im Spektrum aber höher erscheinen als es tatsächlich der Fall ist, was die vorhandene Abweichung eher noch verstärken würde. Strahlungslose Relaxationsprozesse von TDI andererseits lassen die Rate niedriger erscheinen und könnten zur Klärung beitragen. Zur Verifizierung wurde die Lebenszeit der TDI-Untereinheit im Bichromophor gemessen [149]. Sie ist mit 0,9 ns in Lösung fast um den Faktor vier kleiner als die von ungekoppeltem TDI (ohne Seitengruppen). Die wahre Quantenausbeute für den Energietransfer ist damit im Fall der Lösung statt 40 % über 70 %.

Andere Theorien für den Energietransfer heranzuziehen wie den Dexter-Mechanismus würden ebenfalls die Unstimmigkeiten noch vermehren. Lösungen bringen nur Mechanismen, die den Energietransfer blockieren oder die TDI-Fluoreszenz reduzieren und damit die Theorie in Einklang mit den Spektren bringen. Auch ein anderer Wert für den tatsächlichen Abstand, Verunreinigungen der Proben oder Effekte durch Photobleichen oder Ähnliches konnten keine überzeugenden Argumente liefern. Bisher konnte keine eindeutige Ursache für die Abweichung zwischen der anhand der Spektren beobachteten Energietransferrate und der nach dem tatsächlichen Abstand und berechneten Försterradius zu erwartenden Rate nachgewiesen werden. Eine Kombination der diskutierten Möglichkeiten kann aber das Gewünschte leisten.

5.2.5 Einzelmoleküldetektion

Die Untersuchungen wurden unter der Annahme begonnen, dass die mittlere Energietransferrate k_{ET} im Bereich der Fluoreszenzrate k_f liegt. Als Matrizen wur-

den Polyethylen (PE) verwendet, sowie Tetradecan (TD), das anstatt von Hexadecan gewählt wurde, damit sich die kurzkettigeren Moleküle besser an die Perylen-Untereinheit anpassen können. Der Versuch, einzelne Moleküle der TDI-Untereinheit in TD bei direkter Anregung im Fluoreszenzanregungsspektrum zu detektieren, führte sofort zum Erfolg. In Abb. 5.17 ist als Beispiel ein Anregungsspektrum dargestellt, das mit dem Faseraufbau unter Blockung des Anregungslichts mit einem Langpassfilter RG715 detektiert wurde. Signale einzelner Moleküle wurden zwischen 646 und 671 nm gefunden. Die Halbwertsbreiten $\Delta\nu_{hb}$ der Linien streuten bei 3,4 K zwischen 45 und 140 MHz und die maximale Zählrate je Anregungsleistung war nur geringfügig niedriger als bei ungekoppeltem TDI. In der festen Matrix führen die Ankopplung und die zusätzlichen Seitengruppen damit nicht zu einer kürzeren Lebenszeit von TDI.

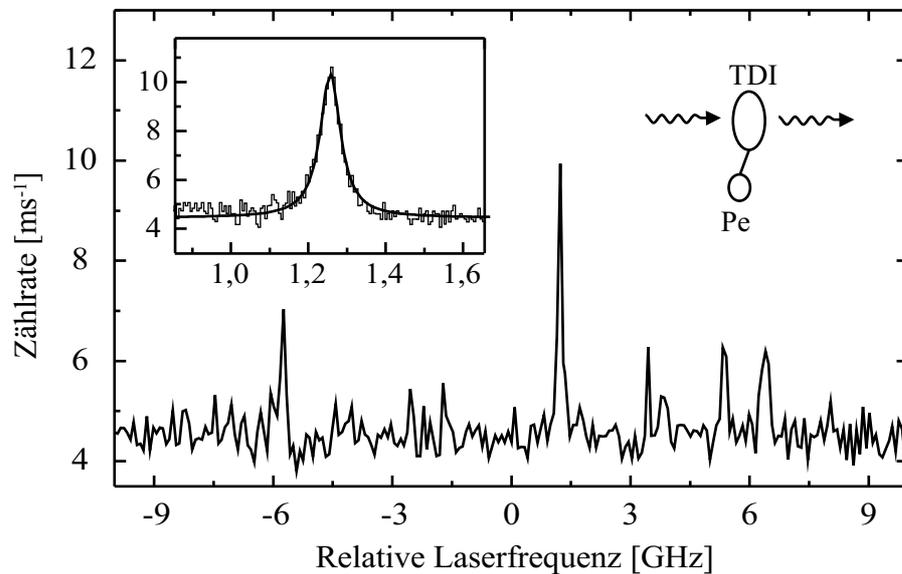


Abbildung 5.17: Fluoreszenzanregungsspektrum der TDI-Untereinheit von Pe-TDI in Tetradecan bei 3,4 K ($0 \text{ GHz} \equiv 651,93 \text{ nm}$, $I = 8 \text{ mW/cm}^2$). Die Unterabbildung zeigt ein Molekül mit angepasster Lorentzkurve der Halbwertsbreite $\Delta\nu_{hb} = 64 \text{ MHz}$.

Nach diesem Test, der nachweist, dass die Kopplung der beiden Chromophore ihre Tauglichkeit für die Einzelmolekülspektroskopie nicht beeinträchtigt, wurde der Farbstofflaser auf den blauen Spektralbereich umgebaut. Zur selektiven Detektion von direkter Pe-Fluoreszenz oder TDI-Fluoreszenz infolge Energietransfer nach Anregung des Pe wurden verschiedene Filterkombinationen getestet, wobei für den Pe-Anteil die Kombination eines Langpass- KV500 (bzw. GG475 für die kurzwelligen Moleküle) und Kurzpassfilters KP600 sich als beste Wahl herausstellte und für den TDI-Anteil der Langpassfilter RG 630 geeignet war. Mit diesen Filtern kann man die gesamte TDI-Fluoreszenz einsammeln, allerdings nur einen Bruchteil der

Pe-Fluoreszenz detektieren, da Pe nur einen kleinen Stokes-Shift aufweist. Falls der Untergrund es erlaubte, wurde auch die Gesamtfluoreszenz durch die alleinige Verwendung eines Langpassfilters GG475 oder KV500 detektiert. In Abb. 5.18 sind die Filterkennlinien gemeinsam mit dem Pe-TDI Fluoreszenzspektrum (allerdings bei Raumtemperatur) zur Veranschaulichung dargestellt.

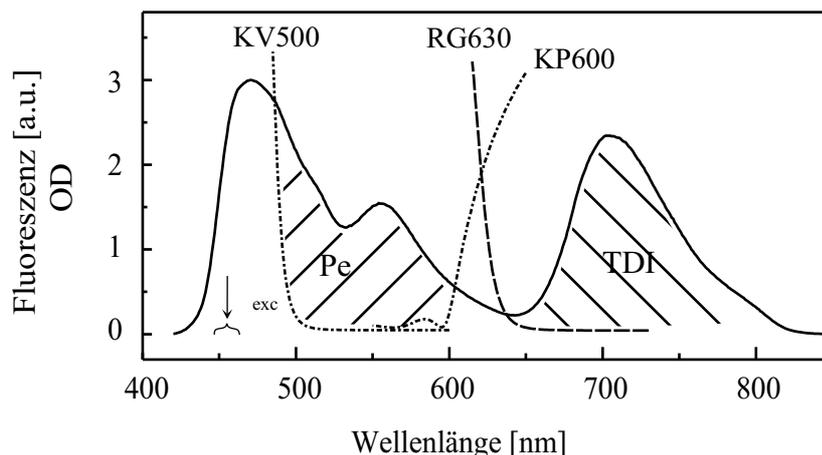


Abbildung 5.18: Fluoreszenzspektrum von Pe-TDI (aus Abb. 5.13 b) zusammen mit den Filterabsorptionsspektren zur Veranschaulichung der Detektionsbereiche für Pe-Fluoreszenz und für TDI-Fluoreszenz. Pe-Fluoreszenz wird bei tiefen Temperaturen jedoch deutlich weniger detektiert als es in der Abbildung mit den Raumtemperaturspektrum erscheint.

Die ersten Experimente zur Detektion von Pe-Anregungsspektren von Pe-TDI / TD wurden am Faseraufbau durchgeführt. Wegen hoher Untergrundfluoreszenz um 530 nm waren sie aber nicht erfolgreich. Nach vielen Versuchen zur Beseitigung dieser Störung wurde der Linsenaufbau verwendet. Die Präparation einer TD Probe ist dabei nur schwer möglich, so dass auf PE als Matrix umgestellt werden musste. Wiederholte Kontrollexperimente mit reinem Pe in den Proben führten immer sofort zur Detektion von Einzelmolekülsignalen, so dass die Probleme nicht durch den Aufbau, sondern durch das zu untersuchende System entstehen. Nach mehreren Versuchen gelang an einer höher konzentrierten Probe die Detektion einzelner Anregungsspektren der Pe-Untereinheiten. Erstaunlicherweise konnten Anregungsspektren nur von solchen Molekülen aufgenommen werden, bei denen die Fluoreszenz allein von Pe stammte, also kein Energietransfer auftrat. Verwendete man bei derselben Verstimmung der Anregungswellenlänge in der Detektion die Filterkombination für TDI-Fluoreszenz, erhielt man nur einen gleichmäßigen, breiten Untergrund, aber kein Anregungsspektrum an der analogen Position. Auch bei anderen Laserfrequenzen im Bereich der Pe-Absorption konnten nie scharfe Linien bei Aufnahme der TDI-Fluoreszenz beobachtet werden. In Abb. 5.19 sind zwei derartige Spektren dargestellt.

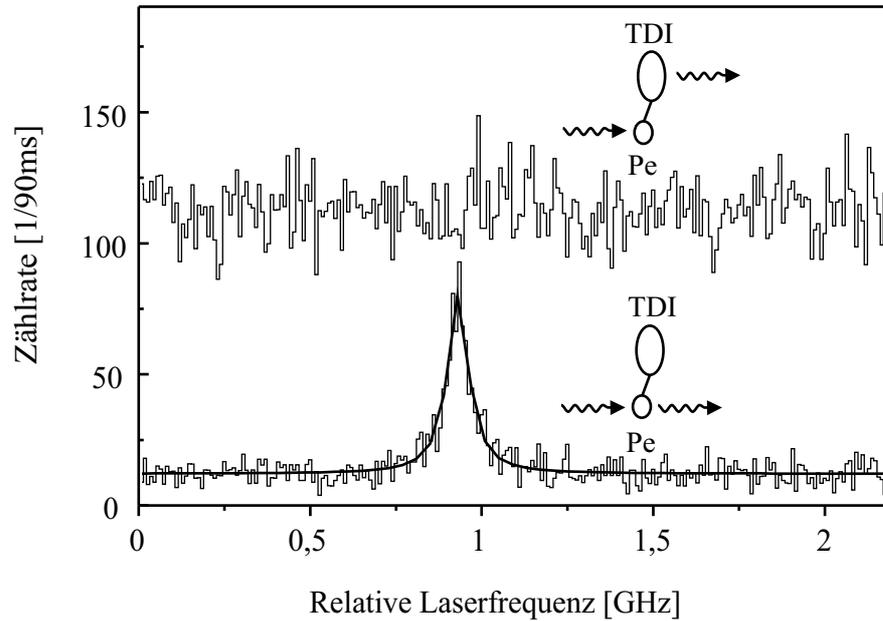


Abbildung 5.19: Fluoreszenzanregungsspektren der Pe-Untereinheit von Pe-TDI in PE bei 1,4 K. Bei Detektion der Pe-Fluoreszenz (unten) zeigt sich die Absorptionslinie eines einzelnen Moleküls, bei Detektion der TDI-Fluoreszenz (oben) jedoch nur breiter Untergrund ohne zusätzliches Signal an der identischen Position (0 GHz \equiv 450,58 nm, $I = 15 \text{ mW/cm}^2$).

Von fast 50 Einzelmolekülsignalen der Pe-Untereinheit, die zwischen 449 und 460 nm detektiert werden konnten, zeigte keines der zugehörigen Spektren unter Verwendung der TDI-Filterkombination ein analoges, lorentzförmiges Signal. Bei den Messungen wurden bevorzugt breitere Moleküle untersucht, die eine höhere Energietransferrate k_{ET} und damit mehr TDI-Fluoreszenz erwarten ließen. Die Halbwertsbreiten $\Delta\nu_{hb}$ der Linien lagen zwischen 70 und 250 MHz. Der breite Untergrund bei Verwendung der TDI-Filterkombination stammt aber von Pe-Absorption, da die Höhe des Untergrundes genau mit der Absorptionsbande von Pe zu- und abnimmt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass schmalbandige Absorptionslinien von Pe nur auftreten, wenn kein Energietransfer stattfindet. Im Rahmen einer Statistik von detektierten Spektren über zusammen ca. 1000 GHz (ca. 1 nm) wurden keine schmalen Absorptionslinien bei Detektion von TDI-Fluoreszenz gefunden. Der Untergrund ist also eine Überlagerung der breitbandigen Fluoreszenz der vielen anderen Moleküle in der höher konzentrierten Probe. Beim Versuch, mit der Technik des Lochbrennens die Linienbreite abschätzen zu können, konnte innerhalb des maximalen Scanbereichs von 30 GHz kein Lochprofil erkannt werden. Vergleicht man die Intensitäten der schmalbandigen Linien mit dem blauen, breitbandigen Untergrund (Pe-Signal von Molekülen mit Energietransfer), integriert über den Pe-

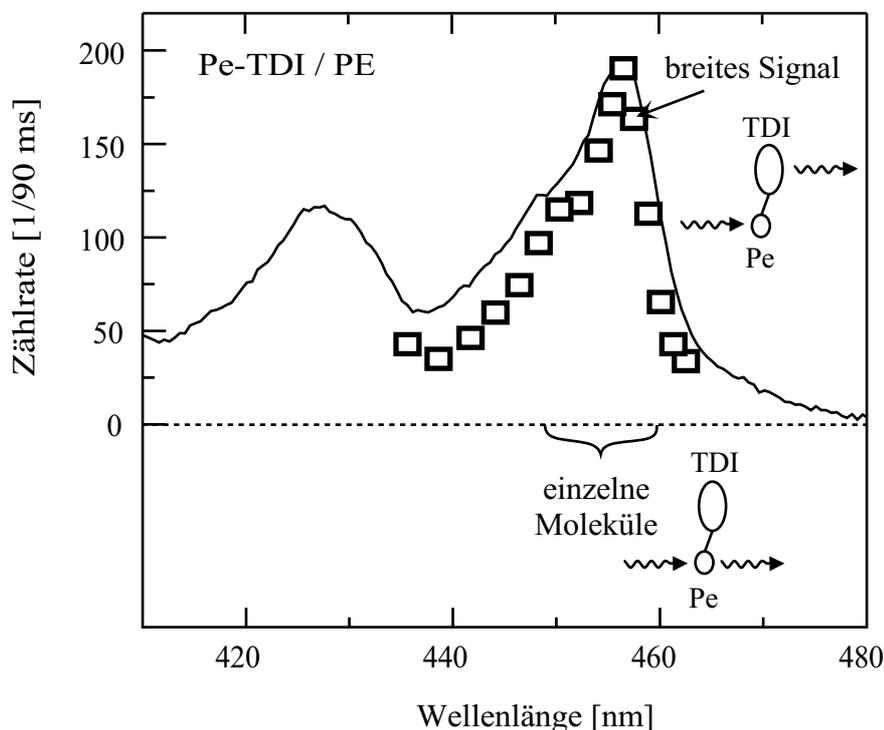


Abbildung 5.20: Vierecke: Mittlere Höhe des Untergrunds bei der Detektion von TDI-Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungswellenlängen. Als durchgezogene Linie ist zum Vergleich ein Ausschnitt des Fluoreszenzanregungsspektrums von Pe-TDI in PE dargestellt, um zu zeigen, dass die TDI-Fluoreszenz von Pe-Absorption und nachfolgendem Energietransfer stammt. Spektren einzelner Pe-Moleküle, bei denen kein Energietransfer auftritt, konnten fast im gesamten Bereich der 0-0 Bande aufgenommen werden.

Absorptionsbereich (ohne Beachtung von Streuuntergrund), zeigt sich, dass weniger als 3 % der Pe-Fluoreszenz aus schmalbandiger Absorption entsteht. Das Verhältnis von Pe-Fluoreszenz zu TDI-Fluoreszenz ist schwer abschätzbar, da nicht genau bekannt ist, wieviel der Pe-Fluoreszenz mit dem Anregungslicht geblockt wird und damit auch nicht, wieviel insgesamt auftritt. Es sollte sich jedoch ein Verhältnis ergeben ähnlich dem im Fluoreszenzspektrum von Abb. 5.14 (a).

Die Erklärung der genannten Ergebnisse wurde in verschiedenen Mechanismen gesucht. Sobald Energietransfer auftritt, wenn auch nur mit sehr geringer Rate, scheinen sich die Spektren, stärker als nach Gl. 5.18 angenommen, zu verbreitern. Möglicherweise wird beim Energietransfer zu viel Energie in der Matrix deponiert (entsprechend des großen Energieunterschieds zwischen dem angeregten Zustand von Pe und TDI von $\sim 7000 \text{ cm}^{-1}$), die nicht schnell genug abgeleitet werden kann und zu einer lokalen Erwärmung führt. Möglicherweise führt auch auftretender Elektronentransfer zur Linienverbreiterung durch die elektrischen Feldfluktuationen. Eine

Erklärung konnte hierfür noch nicht gefunden werden.

Kapitel 6

Mikroskopische Untersuchungen

Dieses Kapitel behandelt alle Experimente, für die das neu aufgebaute Laserscanning-Mikroskop verwendet wurde. Nach ersten Untersuchungen an Testproben, die zur Überprüfung der Funktionsweise und der Abbildungseigenschaften, sowie zur Charakterisierung der Apparatur durchgeführt wurden, sind Einzelmolekülexperimente bei Tieftemperatur und beliebigen Zwischentemperaturen bis zu Raumtemperatur an zahlreichen Systemen ohne Einschränkung auf schmale Absorptionslinien möglich.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei interessante und technologisch relevante, neue Bereiche durch Einzelmoleküluntersuchungen erschlossen, die in den Kapiteln 6.4 und 6.5 dargestellt werden: Untersuchungen von einzelnen Sondenmolekülen in Porensystemen, sowie spektroskopische Messungen an einzelnen, fluoreszierenden Proteinen.

6.1 Testpattern

Im ersten Schritt zur Untersuchung der Abbildungseigenschaften und zur Kontrolle der fehlerfreien Abrasterung der Probe wurde ein reflektierendes Testmuster verwendet, das von G. Jung zur Verfügung gestellt wurde. Zur Herstellung derartiger Proben wird eine Suspension aus Polystyrol-Kugeln (*Serva*) mit Durchmessern von $2\ \mu\text{m}$ ($\pm 1\ \%$) auf eine gereinigte Glasoberfläche aufgebracht, so dass eine (Sub-) Monolage entsteht. Anschließend wird die mit den Kugeln belegte Seite mit Aluminium bedampft, so dass eine etwa 10 nm dicke Schicht entsteht. Die Kugeln werden danach im Ultraschallbad wieder entfernt. Reflektierende Stellen von Aluminium treten damit überall dort auf, wo sich zwischen den Kugeln Lücken befanden.

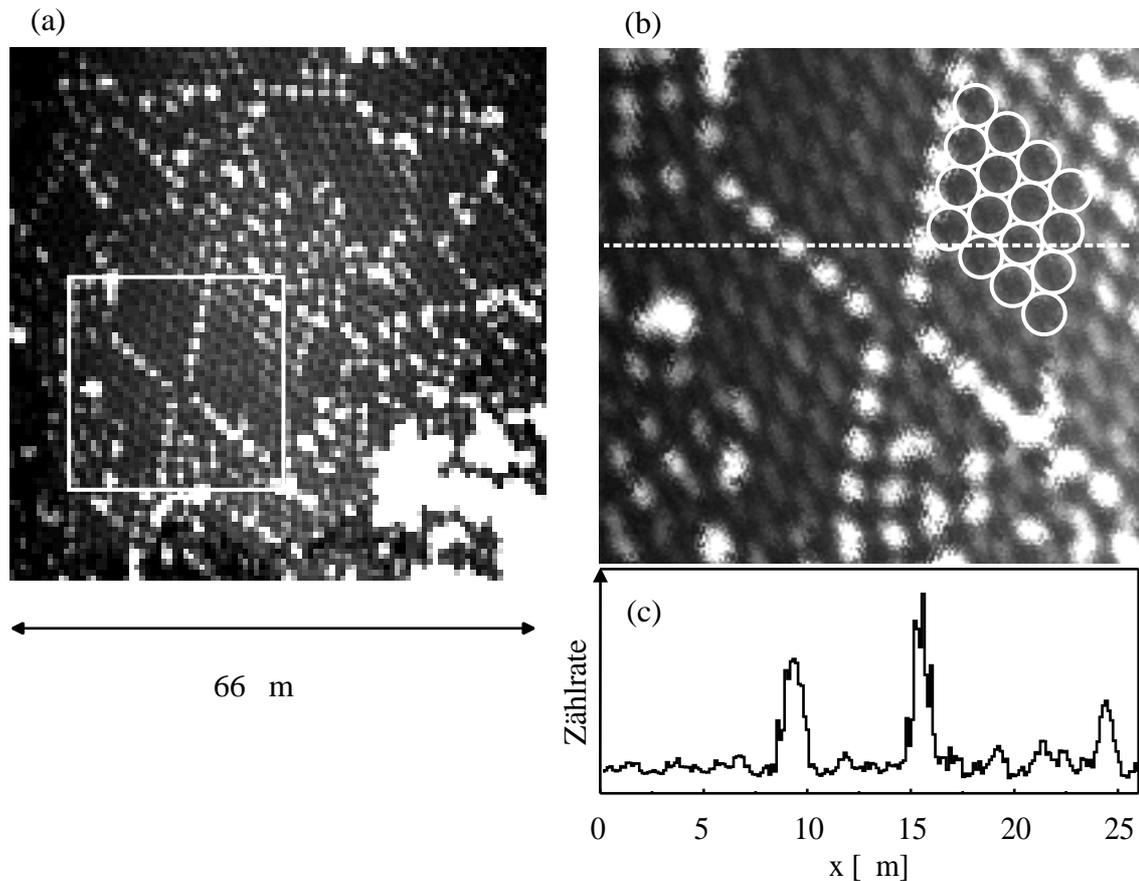


Abbildung 6.1: (a) Reflexionsbild des Testmusters in einem Bereich über $66 \mu\text{m}$ mit mehreren geordneten Bereichen, in denen die Kugeln in dichtester Packung lagen. Die hellen Stellen sind Fehlstellen dieser dichtesten Kugelpackung. Die hellen Bereiche im rechten, unteren Eck sind durchgehende Aluminiumflächen. (b) Ausschnitt aus a, wobei die ursprüngliche Lage der Kugeln in einem kleinen Bereich zur Veranschaulichung rekonstruiert ist. (c) Intensitätsprofil der in b (gestrichelt) eingezeichneten Schnittlinie.

In Abb. 6.1 (a,b) ist ein Reflexionsbild abgebildet, das bei 2 K aufgenommen wurde. Es zeigt Bereiche mit 2-dimensionaler Ordnung, in denen die Kugeln in dichtester Packung lagen. Die helleren Stellen in diesen Bereichen entsprechen den Aluminiumflecken, die in den Löchern zwischen drei aneinander stoßenden Kugeln auftreten. Die genaue Form dieser Flecken, die gleichseitigen Dreiecken mit nach innen gebogenen Seiten der Länge von $\sim 1 \mu\text{m}$ entsprechen, konnte nicht aufgelöst werden. Trotzdem konnte, wie in Abb. 6.1 (b) eingezeichnet, die ursprüngliche Lage der Kugeln rekonstruiert werden. Die tatsächliche Größe der Kugeln stimmt genau mit der über die angelegten Spannungen am Galvanometerscanner aus dem Bildausschnitt berechneten Größe überein. Die wiederholte Aufnahme von Bildern mit Scanzeiten von einer halben Stunde zeigte typischerweise einen Versatz von 1 - 2 Pixeln, was

bei 200×200 Pixeln einem relativen Fehler von weniger als 1 % entspricht.

Die anderen hellen Stellen in Abb. 6.1 sind durch Fehlstellen der dichtesten Kugelpackung entstanden, bei denen z.B. ein Versatz zur quadratischen Anordnung von 4 Kugeln führte oder einzelne Positionen unbesetzt blieben. Auch größere unbesetzte Bereiche, wie in Abb. 6.1 (a) rechts unten, traten auf, die jedoch ohne weiteres Interesse sind. Mit dem in Abb. 6.1 (c) dargestellten Höhenprofil soll ein noch besserer Eindruck von der Abbildungsqualität gegeben werden, der in den Bilddarstellungen allgemein verfälscht wird.

Mit diesen Versuchen konnte die zufriedenstellende Funktion des Scanners nachgewiesen, sowie die Eichung des abgebildeten Bereichs bestätigt werden. Die Auflösung der Abbildung kann auf ca. $1 \mu\text{m}$ abgeschätzt werden. Da mit diesen Proben keine Aussage über die Einsammeleffizienz gemacht werden kann, wurde im nächsten Schritt auf fluoreszierende Einzelmolekülproben übergegangen.

6.2 Terrylen in Polyethylen als Testsystem bei tiefen Temperaturen

Terrylen (Te) in Polyethylen (PE) ist in der Einzelmolekülspektroskopie ein vielfach untersuchtes Gast-Wirt-System. Für die Testexperimente wurde ein 10^{-8} molarer Film hergestellt, auf ein Deckglas geklebt und in Richtung zum Objektiv in der Probenhalterung festgeklemmt. Bei dieser Konzentration sind im Anregungsvolumen noch etwa 100 Moleküle, die spektral selektiert werden können. Neben dem dichroitischen Strahlteiler (DC595) wurde ein Langpass- (OG590) oder Bandpassfilter (BP 620-60) im Detektionsstrahlengang verwendet. In Abb. 6.2 ist ein Beispiel für die erhaltenen Fluoreszenzanregungsspektren abgebildet. Die Spektren zeigen keine bemerkenswerten Unterschiede gegenüber früheren Spektren, die mit dem Linsen- oder Faseraufbau aufgenommen wurden.

Lässt man den Laser bei einer festen Frequenz (innerhalb der inhomogen verbreiterten 0-0 Bande) laufen und scannt räumlich über die Probenfläche, so kann man ebenfalls einzelne Moleküle selektieren. Man muss allerdings bedenken, dass bei dieser Konzentration noch weitere Moleküle im Anregungsvolumen sind, die nur aufgrund ihrer scharfen Absorptionsfrequenz nicht angeregt werden. Bei Anregung in eine Schwingungsbande der Chromophore, wie in der Einzelmolekülmikroskopie üblich, würden all diese Moleküle angeregt und man hätte eine etwa um zwei Größenordnungen zu hoch konzentrierte Probe. Die Fluoreszenzbilder zeigen im allgemeinen runde Spots, bei denen jedoch insbesondere bei höheren Leistungen immer wieder

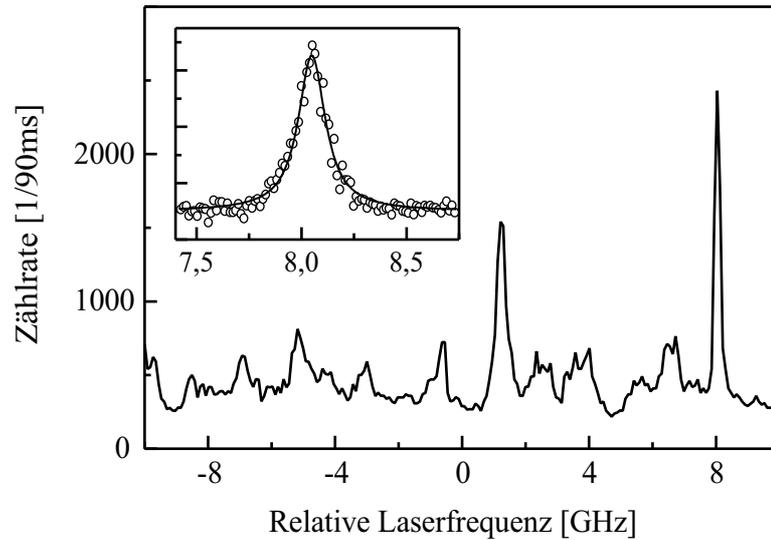


Abbildung 6.2: Fluoreszenzanregungsspektren einzelner Te-Moleküle in PE bei 3,2 K ($I = 2$ W/cm², 0 GHz \equiv 573,73 nm). Die Unterabbildung zeigt das Molekül mit der stärksten Emission (bei einem Zehntel der Leistung) zusammen mit der angepassten Lorentzkurve der Halbwertsbreite $\Delta\nu_{hb} = 160$ MHz.

einige Pixel durch spektrale Sprünge der Absorptionsfrequenz dunkel sind (Abb. 6.3).

Zur Bestimmung des Auflösungsvermögens wurde die Halbwertsbreite Δx_{hb} der Fluoreszenzspots durch Anpassung von Gaußkurven ermittelt. Das Intensitätsprofil im Fluoreszenzbild ergibt sich dabei allgemein aus der Faltung des tatsächlichen Intensitätsprofils des Objekts mit der Instrumentenfunktion. Da aber die Größe der Moleküle so gering ist, stellt das detektierte Intensitätsprofil direkt die instrumentelle Auflösung dar. Die Auswertung beschränkte sich auf Fluoreszenzbilder, die mit geringen Leistungen aufgenommen wurden, da auch räumlich eine Sättigungsverbreiterung auftritt und außerdem die zunehmende spektrale Diffusion Artefakte verursacht. Die mittlere laterale Auflösung wurde zu 600 (± 100) nm ermittelt (Abb. 6.4 b).

Zur Bestimmung der axialen Auflösung muss die Probe über die z-Feinverstellung verfahren werden, was bisher nur von Hand möglich ist. Im Imagingmodus hätte man alternativ die Möglichkeit, den Detektor zu verfahren, und zwar um die um M^2 vergrößerte Strecke (Vergrößerungsfaktor M der mikroskopischen Abbildung). Im konfokalen Aufbau muss aber die Probe verfahren werden. Die auftretenden mechanischen Störungen führen jedoch zu lateralen Abweichungen, so dass ein gewähltes Molekül während des z-Scans immer wieder lateral aus dem Fokus und in den Fokus gelangt. Ein Beispiel für einen derartigen z-Scan ist für einen anderen Pro-

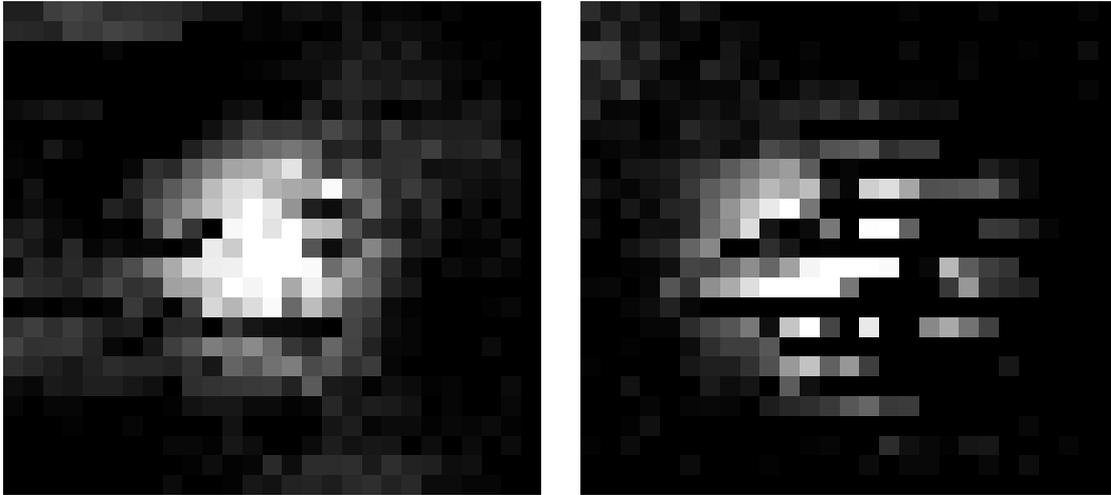


Abbildung 6.3: Fluoreszenzbilder zweier Te-Moleküle in PE bei 3,2 K und hoher Intensität ($I = 200 \text{ W/cm}^2$, $\lambda_{exc} = 573,10 \text{ nm}$, Ausschnitt von $1,8 \mu\text{m}$). Die dunklen Pixel (Integrationszeit 100 ms/Pixel) ohne Fluoreszenz sind durch reversible spektrale Sprünge der Absorptionsfrequenzen der Moleküle verursacht.

beneinbau in Abb. 6.4 (c) dargestellt. Hier ist der Film von Te in PE zwischen zwei Objektträgern fixiert. Im Bereich niedrigen Untergrunds befindet sich der Fokus im Glas, bei erhöhtem Untergrund liegt der Fokus im PE. Die hohen Zählraten stammen vom Signal eines Moleküls. Die Einhüllende zeigt die axiale Fokusaussdehnung und damit die Auflösung mit $\Delta z_{hb} \approx 2 \mu\text{m}$.

Alternativ kann für verschiedene z-Positionen jeweils ein Fluoreszenzbild aufgenommen und aus den damit exakter bestimmbareren Signalintensitäten die z-Auflösung bestimmt werden (dies wurde am System TDI / PMMA mit Probenseite entgegengesetzt zum Objektiv durchgeführt; die ermittelten Auflösungen waren jedoch sowohl lateral als auch axial schlechter, was einerseits auf mangelhafte Justierung zurückgeführt werden muss, andererseits wohl auf fehlende Deckglaskorrektur des Objektivs). Insgesamt ist der Wert der lateralen Auflösung, der mit Probenseite in Richtung zum Objektiv ermittelt wurde, mit $\Delta x_{hb} \approx 0,6 \mu\text{m}$ im Verhältnis zur Wellenlänge, die etwa dieselbe Größe hat, zufriedenstellend. Die axiale Auflösung wurde nur für den Fall der Transmission des Anregungslichts durch ein Deckglas (Dicke ca. $130 \mu\text{m}$) zu $\Delta z_{hb} \approx 2 \mu\text{m}$ bestimmt und ist deutlich schlechter als der theoretisch zu erwartende Wert.

Von größerer Bedeutung als die erreichbare Auflösung sind die erreichbaren Zählraten, die bei einzelnen Emitttern stark begrenzt sind. Alle Informationen über die Moleküle können nur aus den detektierten Photonen gewonnen werden, und dabei führt jedes verlorene Photon zu einem Verlust an zeitlicher Auflösung. Die Optimie-

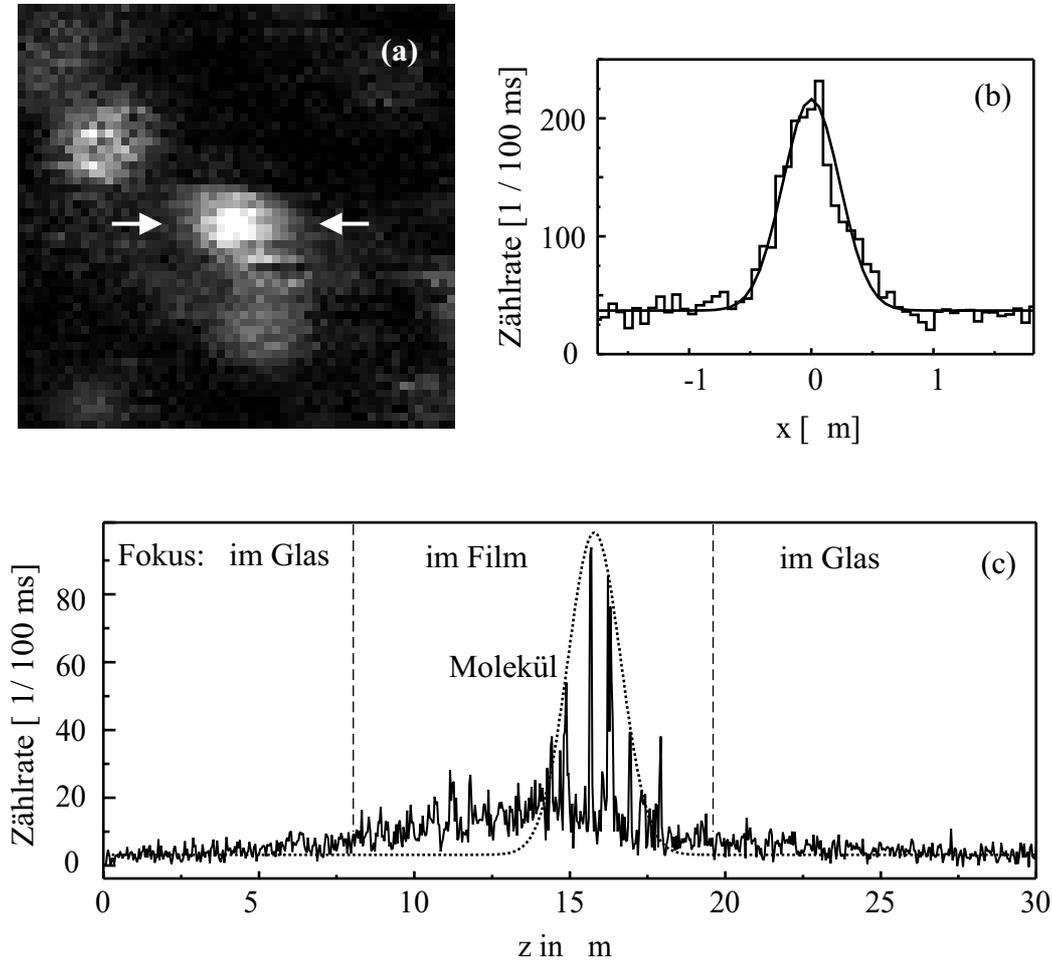


Abbildung 6.4: (a) Fluoreszenzbild eines Te-Moleküls in PE bei 3,2 K ($I = 0,2 \text{ W/cm}^2$, $\lambda_{exc} = 573,10 \text{ nm}$, Ausschnitt von $3,6 \mu\text{m}$). Das markierte Molekül ist während der Bildaufnahme in einen Dunkelzustand übergegangen, so dass der Spot nicht exakt rund erscheint. (b) Intensitätsprofil der in a gekennzeichneten Stelle. Die angepasste Gaußkurve hat eine Halbwertsbreite von $0,6 \mu\text{m}$. (c) Versuch eines z-Scans durch Verdrehen der z-Feinverstellungsschraube an einer anderen Probe von Te in PE, bei der der Film zwischen zwei Objektträger geklemmt war. Im Bereich mit erhöhtem Untergrund liegt der Fokus im PE-Film. Das Molekülsignal tritt nur abschnittsweise auf, da das Drehen an der Schraube zu Dejustierung führte. Die Einhüllende (gepunktet) vervollständigt die fehlenden Bereiche zum erwarteten Signal ($\Delta z_{hb} \approx 2 \mu\text{m}$).

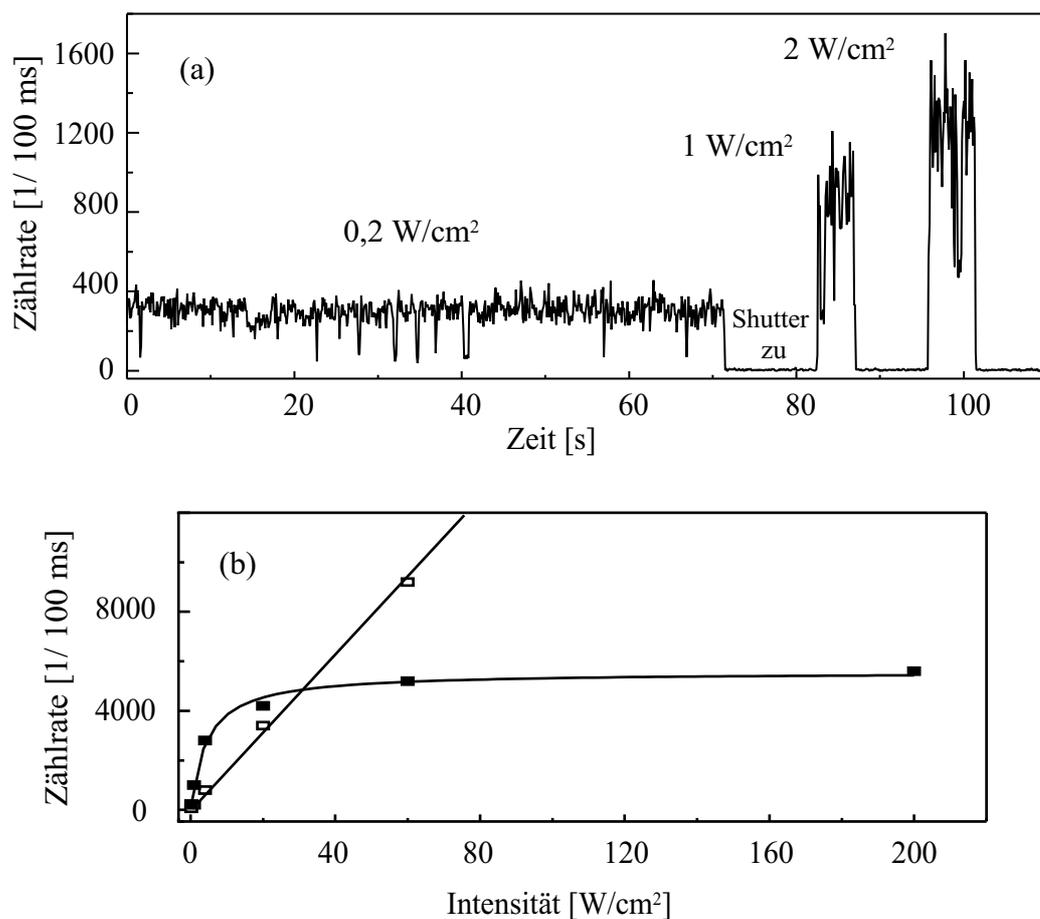


Abbildung 6.5: (a) Zeitliche Entwicklung der Zählrate eines Te-Moleküls in PE bei verschiedenen Anregungsintensitäten ($T = 3,2$ K, $\lambda_{exc} = 573,10$ nm). Deutliche Unterbrechungen der Fluoreszenz sind sichtbar, aus denen die Untergrundzählrate bestimmt werden kann. (b) Intensitätsabhängigkeit von Untergrundzählrate und Molekülsignal. Die durchgezogenen Linien sind ein linearer Fit für den Untergrund und eine Anpassung nach Gl. 3.11 mit $R_{\infty}^{3LS} \cdot \eta_{det} = 56\,000$ C/s und $I_S = 5$ W/cm².

rung der Detektionseffizienz ist dementsprechend besonders sorgfältig durchzuführen und von höchster Priorität (siehe Kap. 2.4.2 und 4.4.4).

Zur Bestimmung der maximal detektierbaren Zählrate wurden am System Te in PE Sättigungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde schrittweise die Leistung erhöht und jeweils eine kurze Zeitspur der gesamten Zählrate detektiert (Abb. 6.5 a). Aus diesen Daten konnten Molekülsignal und Untergrundzählrate bestimmt und gegen die Intensität auf der Probe angetragen werden. Neben der Sättigungsintensität erhält man die maximale Zählrate von einem einzelnen Te-Molekül, die 56 000 Counts pro Sekunde betrug. Der Untergrund stieg erwartungsgemäß linear an und war schon bei einer Anregungsintensität von 40 W/cm² stärker als die Molekülflu-

reszenz. Mit dem Linsenaufbau wurden im Vergleich maximal 200 000 C/s [151] erzielt, also etwa die vierfache Zählrate.

Die geringere Zählrate muss auf den geringeren Einsammelwinkel des Objektivs (siehe Abb. 4.14) im Vergleich zum Parabolspiegel (\sim halber Raumwinkel) zurückgeführt werden, aber auch auf Abbildungsfehler, die nicht genauer charakterisiert werden konnten. Diese lassen sich auch aufgrund der Abweichung der erreichten Auflösung vom theoretischen Wert vermuten. Inzwischen wurde zudem festgestellt, dass einzelne Linsen des Objektivs verklebt sind und dieser Kleber nach einem oder mehrerer Abkühlzyklen viele Sprünge zeigt, die die Transmission und die Abbildung verschlechtern. Der Versuch, den Kleber vollständig zu entfernen, erscheint wenig erfolgversprechend, weil die einzelnen Linsen danach nicht mehr optimal gehalten werden können und zudem der Effekt des Klebers in die Abbildungseigenschaften des Objektivs eingeht. Die optimale Lösung wäre, ein Objektiv ohne verklebte Linsen zu finden.

6.3 Terrylendiimid in Polymethylmethacrylat als Testsystem im gesamten Temperaturbereich

Nach der Behandlung der spektral hochauflösenden Kontrollexperimente im letzten Abschnitt werden in diesem Teil die Testuntersuchungen vorgestellt, bei denen einzelne Moleküle räumlich isoliert wurden und über den gesamten Temperaturbereich selektiv untersucht werden konnten. Die direkte Verwendung der in Abschnitt 6.2 benutzten Probe von Te / PE würde bei einer Erhöhung der Temperatur keine Einzelmolekülselektion mehr erlauben, da die Konzentration unter diesen Bedingungen zu hoch ist. Zudem ist es bei höheren Temperaturen, bei denen die Absorptionslinien sowieso breit sind, sinnvoll, im Bereich einer Schwingungsbande anzuregen und die gesamte Fluoreszenz zu detektieren. Als Chromophor, für das auch der Farbstofflaser im Rhodamin6G-Betrieb weiter verwendet werden konnte, eignete sich dazu Terrylendiimid (TDI). Als Matrix wurde Polymethylmethacrylat (PMMA) gewählt, das im Arbeitskreis schon von C. Seebacher bei Raumtemperaturexperimenten verwendet wurde und zu sehr geringen Photobleichraten von TDI führte. Als Anregungswellenlängen wurden 584 nm oder 594 nm verwendet, außerdem wurde der dichroitische Spiegel DC595 und der Langpassfilter RG630 (bzw. der Notchfilter 594) eingesetzt.

Neben der Bestimmung der Auflösung, wie schon in Abschnitt 6.2 beschrieben, wurden bei Raumtemperatur polarisationsabhängige Experimente durchgeführt, die die Dipoleigenschaft der Moleküle zeigen. Dazu wurde der doppelte Fresnel-Rhombus

im Anregungsstrahlengang in Schritten von 30° effektiver Drehung der Schwingungsebene des linear polarisierten Lichts verändert und jeweils ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Die polarisationsabhängigen Reflexionskoeffizienten des dichroitischen Strahlteilers und der Spiegel im Strahlengang führen dabei häufig zu einer polarisationsabhängigen Variation der Anregungsintensität, die geeignet korrigiert werden muss. Zwei der aufgenommenen Fluoreszenzbilder sowie die Abhängigkeit der Fluoreszenzzählrate dreier Moleküle vom Polarisationswinkel φ sind in Abb. 6.6 dargestellt. Die Zählraten zeigen entsprechend Gl. 2.26 einen für Übergangsdipolmomente typischen, $\cos^2 \varphi$ -förmigen Verlauf.

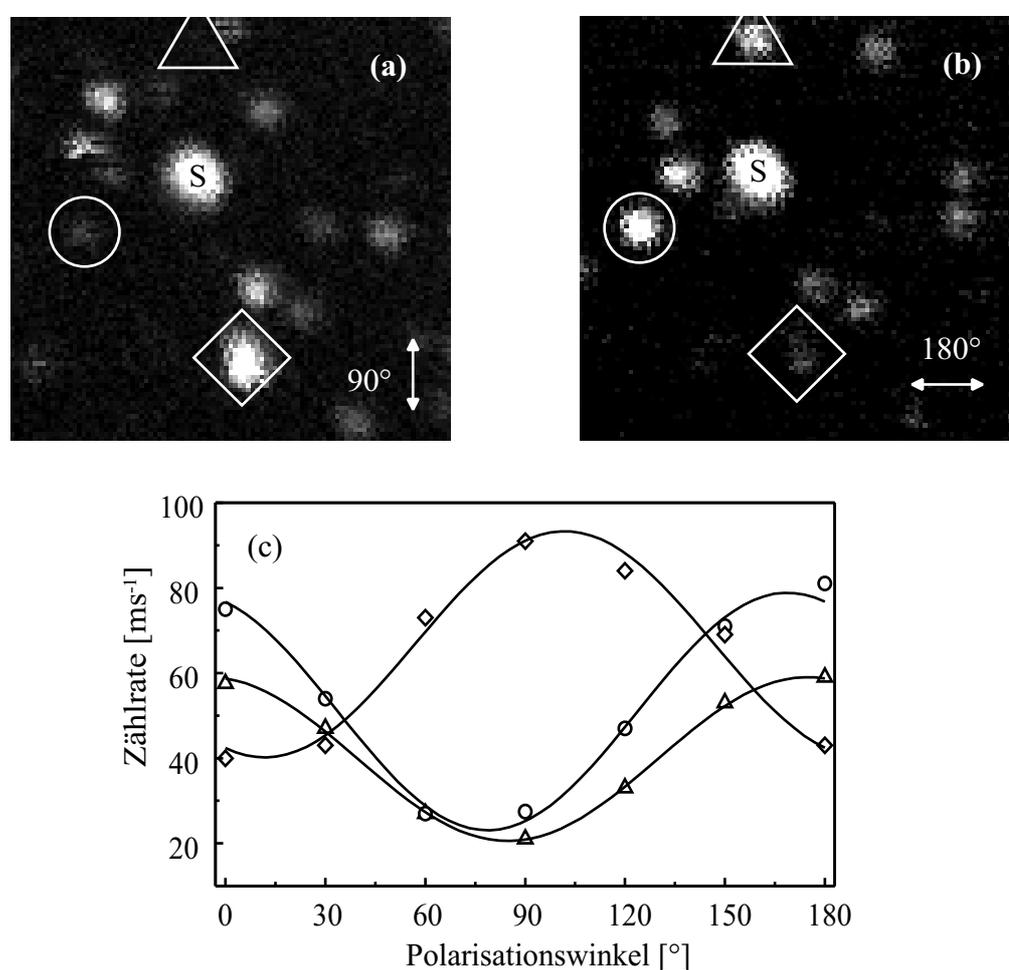


Abbildung 6.6: (a,b) Fluoreszenzbilder von TDI bei Raumtemperatur bei zwei verschiedenen Anregungspolarisationen ($\lambda_{exc} = 584 \text{ nm}$, $I = 1 \text{ kW/cm}^2$, Ausschnitt von $13 \mu\text{m}$). Der mit „S“ bezeichnete Intensitätsbereich stammt nicht von einem Molekül, sondern ist ein Störreflex. (c) Abhängigkeit der in a,b markierten Moleküle von Polarisationswinkel φ . Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen entsprechend der Formel $I_f = U + S \cos^2(\varphi - \varphi_0)$.

Der in Abb. 6.6 mit „S“ bezeichnete Bereich erhöhter Intensität zeigt keine Polarisationsabhängigkeit, und lässt sich auch nicht ausbleichen. Er wird durch reflektiertes Anregungslicht verursacht. Möglicherweise tritt die Reflexion durch eine Blase oder eine Verunreinigung im PMMA-Film auf, es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Anregungslicht für diese Stellung der Scannerspiegel direkt von einer Linse des telezentrischen Systems oder einem Kryostatenfenster auf das Pinhole reflektiert wird. Diese hohen Intensitäten schwächen die Filter nicht ausreichend ab und es entstehen Intensitätsspot, ähnlich denen einzelner Moleküle.

Dieselbe Probe wurde nun abgekühlt, um einzelne Moleküle über den gesamten Temperaturbereich zu detektieren. Bei einer Auswahl verschiedener Temperaturen wurde von einzelnen Molekülen jeweils ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die Verfolgung eines individuellen Moleküls über den gesamten Temperaturbereich erwies sich als schwierig, da bei Temperaturänderungen um mehr als etwa 20 K eine Neu- bzw. Nachjustierung nötig war. Für diese Testuntersuchungen wurde bei jeder Temperatur neu justiert, ein Bild aufgenommen und von einigen der erschienenen Moleküle ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. In Abb. 6.7 sind Spektren für die Temperaturen 197 K, 133 K, 86 K und 4 K dargestellt.

Nur das Spektrum für 4 K (Abb. 6.7 d) zeigt die Nullphononenlinie mit einer Phononenseitenbande. Bei höheren Temperaturen ($T > \sim 30$ K, Abb. 6.7 a-c) führen die Verbreiterungsmechanismen durch Phononen- und TLS-Kopplung nur noch zu einer breiten Bande (abgesehen von der Schwingungsbande um 720 nm), die wie schon aus anderen Untersuchungen bekannt (Kap. 5.1.5) im Tieftemperaturbereich eine Blaushift zeigt. Eine quantitative Auswertung der Daten ist leider nicht möglich, da die Linien weder durch Gauß- noch durch Lorentzfunktionen zufriedenstellend angepasst werden können. Außerdem wurden im wichtigen Bereich entscheidender Änderungen zwischen 4 und 86 K zu wenige Spektren aufgenommen.

Die Funktionsfähigkeit der Apparatur mit der Bilderzeugung durch Rasterscannen des Strahls über die Probe ist damit aber über den gesamten Temperaturbereich bestätigt. Verbesserungen sind hauptsächlich am Objektiv nötig. Neben weiteren Bemühungen, ein Objektiv ohne verklebte Linsen zu finden, sollten Alternativen wie Reflexionsobjektive und *Solid Immersion Lenses* in Betracht gezogen werden. Weitere Überlegungen in Richtung eines geeigneten Immersionsmaterials für tiefe Temperaturen stellen zusätzliches Optimierungspotential dar.

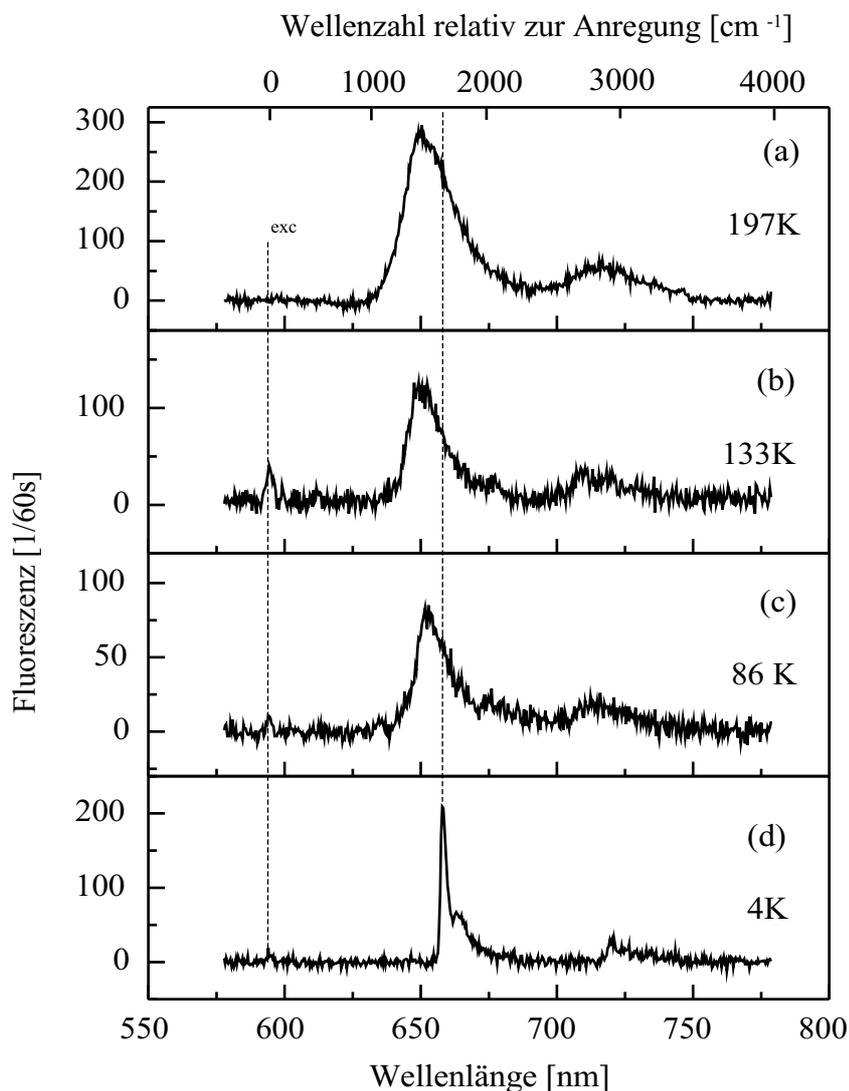


Abbildung 6.7: Fluoreszenzspektren einzelner TDI-Moleküle in PMMA bei verschiedenen Temperaturen ($\lambda_{exc} = 594 \text{ nm}$, $I = 1 \text{ kW/cm}^2$, Integrationszeit 60 s, Auflösung $\sim 30 \text{ cm}^{-1}$). Bei tiefen Temperaturen von 4 K (a) zeigt sich die Nullphononenlinie im Abstand von 1640 cm^{-1} zur Anregung, sowie die Phononenseitenbande. Bei höheren Temperaturen (b-d) tritt Linienverbreiterung ein, sowie eine Verschiebung des Maximums zu kürzeren Wellenlängen.

6.4 Einzelmoleküle als Sonden in beschränkter Geometrie

In nanoporöse, anorganische Wirtsmatrizen eingelagerte Gastmoleküle [175] stellen eine neue Klasse von Materialien dar, deren Herstellung und Untersuchung von großem, technologischem Interesse ist. Einzelne Farbstoffmoleküle als Gäste können

als Sonden zur Untersuchung der spezifischen Wechselwirkungen, lokaler Felder und der Auswirkungen der beschränkten Geometrie genutzt werden. Mechanische Freiheitsgrade der eingelagerten Chromophore lassen neuartige Untersuchungen von Rotations- und Translationsbewegungen (Diffusion) und die Identifizierung von auftretenden Gleichgewichtslagen über charakteristische Absorptionssites im Spektrum erwarten. Die Realisierung molekularer Schalter durch gezielte Anregung individueller Moleküle und die Erzeugung von Funktionen wie dem Öffnen oder Schließen eines Kanals durch ein einzelnes Molekül wären faszinierend und würden einen großen Schritt in Richtung der Idee molekularer Maschinen von R. P. Feynman [176] darstellen.

Als Materialien für den Einbau kleinerer Farbstoffmoleküle eignen sich mikroporöse Molekularsiebe wie Zeolithe und AlPO_4 mit Porendurchmessern von 3 bis 15 Å. Die Entwicklung neuer Materialklassen, wie der Familie der mesoporösen Molekularsiebe M41S mit wohldefinierten Porenöffnungen im Bereich zwischen 15 und 100 Å, erlaubt auch die Verwendung voluminöserer Farbstoffe, wodurch eine große Variabilität in der Wahl der Größe der Poren als auch ihrer Topologie möglich ist. Durch Behandlung der inneren Oberflächen kann zudem die Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Wirtsmaterial über die Polarität gezielt gesteuert werden. In Abb. 6.8 ist die große Variationsmöglichkeit an Wirtsmaterialien und Farbstoffmolekülen zur Steuerung spezieller Wechselwirkungen veranschaulicht.

Neben der Bedeutung dieser Materialien für die Katalyse wurden sie in den letzten Jahren auch im Bereich der optischen Spektroskopie verwendet. Durch ihre hohe Orientierungsordnung eignen sie sich als Trägermaterial für Farbstoffe mit nichtlinearoptischen Eigenschaften zur Frequenzverdopplung (*Second Harmonic Generation*, SHG) [177]. Es gelang auch die Realisierung eines Mikrolasers mit Pyridinfarbstoffen eingelagert in ein AlPO_4 -5-Nanocomposit [178]. Durch spektrales Lochbrennen und Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie wurde ein optischer Schalter entdeckt, bei dem ein Thionin-Molekül innerhalb eines Hohlraumes des Faujasit lichtinduziert zwischen zwei Adsorptionsplätzen wechselt [179]. Außerdem konnten molekulare Drähte in den Kanälen mesoporöser Molekularsiebe synthetisiert werden [180].

Die schlechte optische Qualität dieser Materialien, die meist in Pulverform mit Korngrößen im μm -Bereich vorliegen, erfordert zur Einzelmoleküldetektion auch bei tiefen Temperaturen den Einsatz mikroskopischer Techniken, um eine geeignete Probenstelle auswählen zu können. Die ersten Experimente an diesen Proben wurden noch mit dem Linsenaufbau durchgeführt, wobei der Probenort eindimensional durch die Höhenverstellung variiert werden musste. Für weitere Messungen eignet sich jedoch der neue Aufbau deutlich besser. Die folgenden Abschnitte beschränken sich auf die Darstellung von Vorversuchen, in denen gezeigt wird, dass einzelne Moleküle in der-

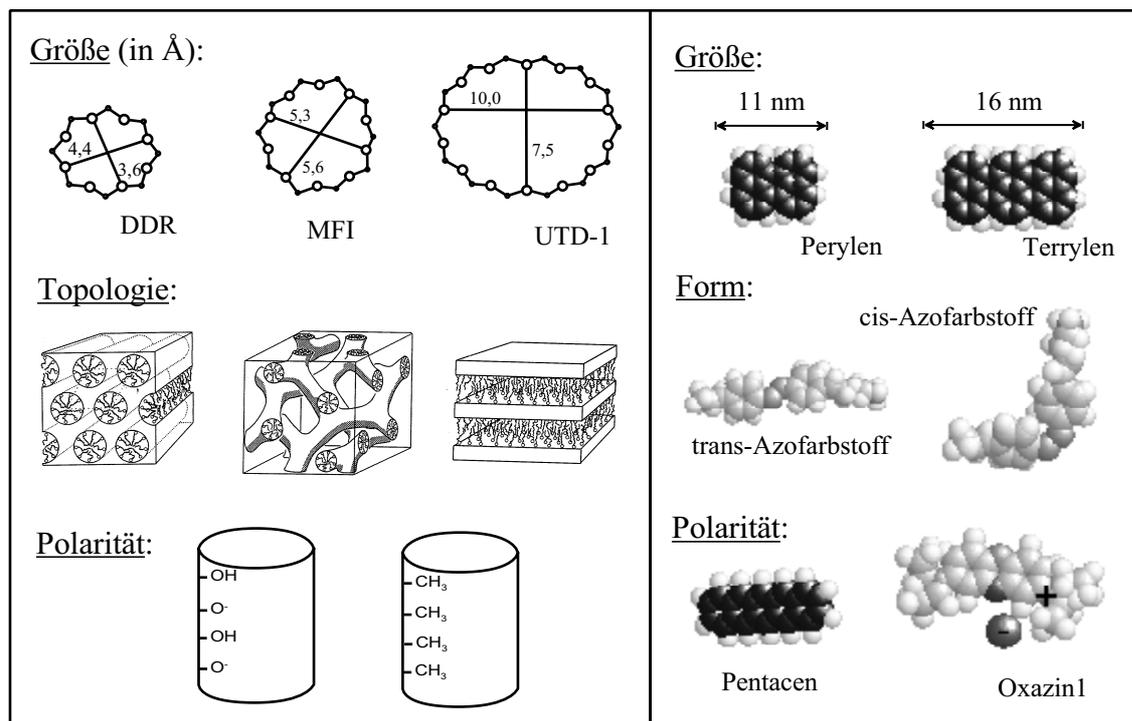


Abbildung 6.8: Variationsmöglichkeiten bei den porösen Wirtsmaterialien (links; oben: verschiedene Porosile, mitte: Strukturen der M41S-Familie) und den einlagerbaren Farbstoffmolekülen.

artigen Strukturen bei tiefen Temperaturen tatsächlich detektiert werden können.

6.4.1 Terrylen in M41S

Bisher wurden Tieftemperaturexperimente an Proben durchgeführt, bei denen Terrylen (Te) in Molekularsiebe der M41S-Familie [181] eingelagert wurde. Diese Wirtsmaterialien sind in ihrer Struktur amorph, zeigen aber regelmäßige Porenanordnungen mit wohldefinierten Porengrößen. Ihr Grundgerüst besteht aus SiO_2 , wobei auf den inneren Oberflächen Silanolgruppen auftreten, die weitere Modifizierungen erlauben.

Bei der Herstellung aus silikatischen Lösungen sind die dabei verwendeten Tenside von grundlegender Bedeutung. Durch die hydrophile Kopfgruppe und die hydrophobe Schwanzgruppe der Tensidmoleküle bilden sich supramolekulare Anordnungen, um die sich das anorganische Material anordnet. Über die Länge der Schwanzgruppe kann die Topologie bestimmt werden. Bei Verwendung eines Tensids mit einer unpolaren Gruppe aus 12 Kohlenstoffatomen entsteht das Molekularsieb MCM-41

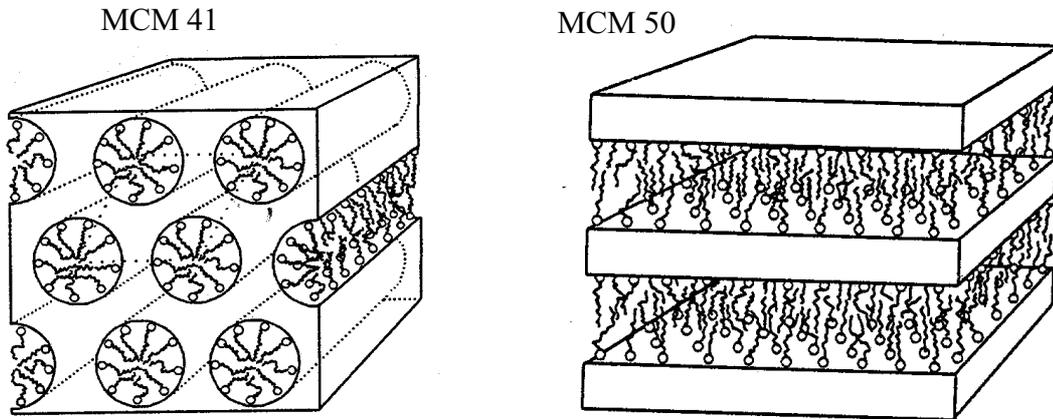


Abbildung 6.9: Kanalstrukturen der mesoporösen Materialien MCM-41 und MCM-50 mit eingelagerten Tensiden.

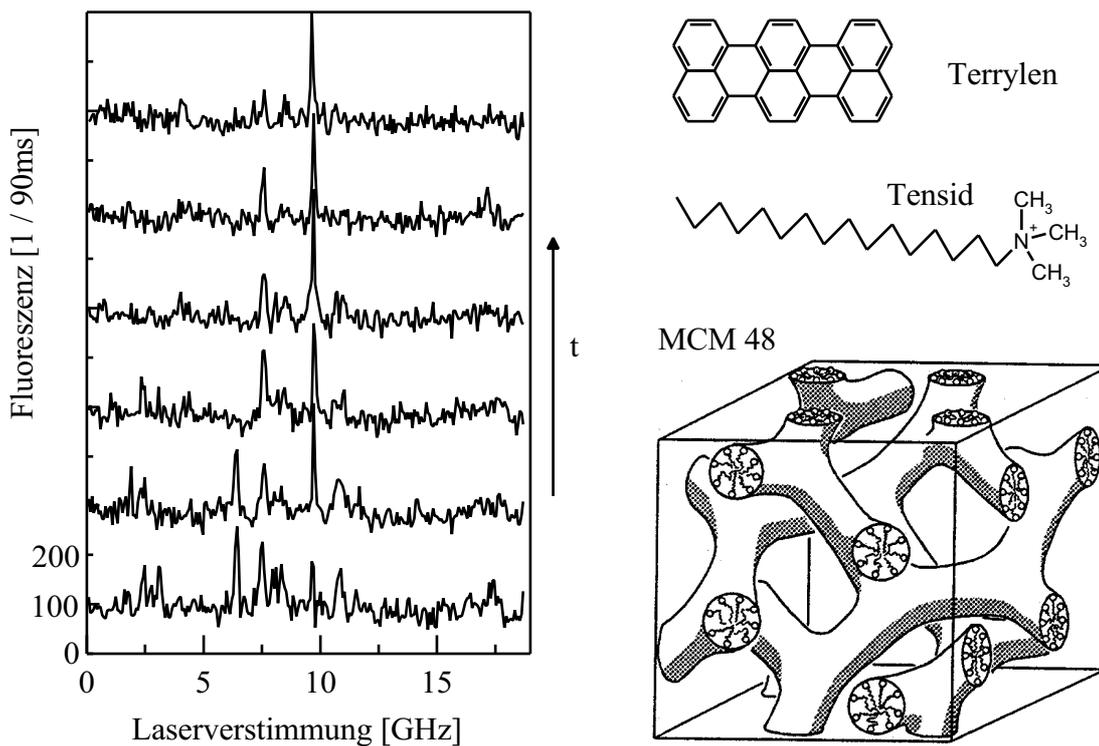


Abbildung 6.10: Fluoreszenzanregungsspektren von einzelnen Terrylen-Molekülen, die mit den Tensiden in die Kanalstrukturen von MCM-48 eingelagert sind ($T = 1,4$ K, $I = 0,1$ W/cm², 0 GHz \equiv 568,46 nm). Die Spektren wurden aufeinanderfolgend ca. alle 30 s gestartet und zeigen starke spektrale Dynamik. Rechts sind die Strukturformeln von Terrylen und den Tensiden, sowie die Kanaltopologie des MCM-48 dargestellt.

mit einer hexagonalen Anordnung eindimensionaler Kanäle mit einem Durchmesser von $\sim 25 \text{ \AA}$. Bei einer Kettenlänge von 16 C-Atomen entsteht MCM-48, das zwei voneinander unabhängige, dreidimensionale Kanalsysteme mit einem Durchmesser von $\sim 35 \text{ \AA}$ enthält. Bei Verwendung von Tensiden mit einer Kettenlänge von 22 C-Atomen entsteht MCM-50, eine lamellare Struktur mit Schichtabständen von $\sim 35 \text{ \AA}$ (siehe Abb. 6.9 und 6.10).

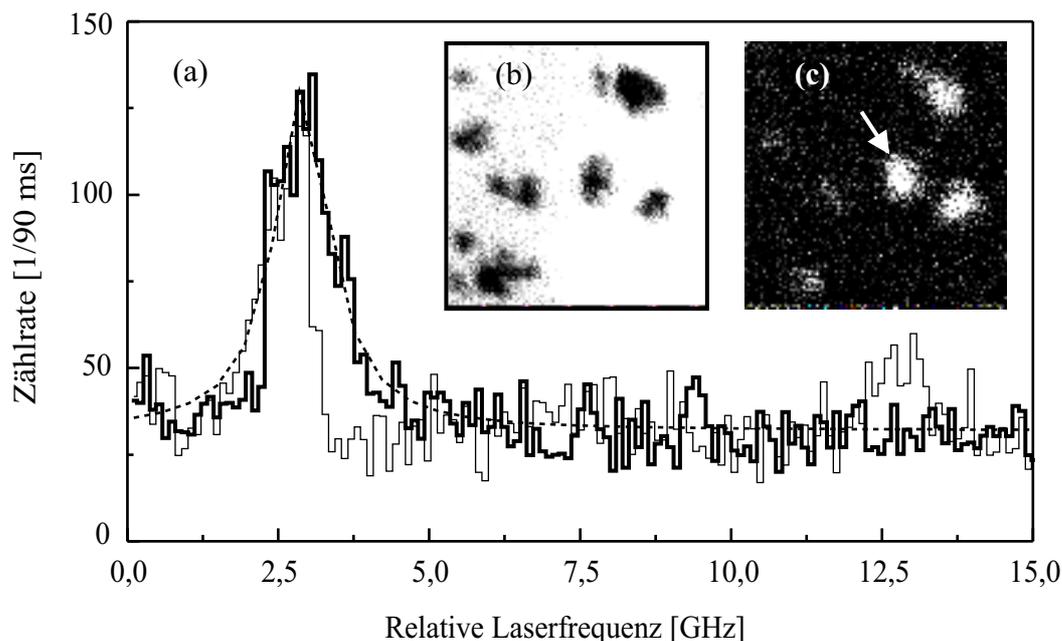


Abbildung 6.11: (a) Fluoreszenzanregungsspektren eines einzelnen Terrylen-Moleküls, das mit den Tensiden in die Kanalstrukturen von MCM-48 eingelagert ist ($T = 3 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ W/cm}^2$, $0 \text{ GHz} \equiv 568,43 \text{ nm}$). Während des zweiten Scan (dünne Linie) hat das Molekül irreversibel seine Absorptionsfrequenz gewechselt. Die Lorentz Anpassung (gestrichelte Linie) hat eine Halbwertsbreite $\Delta\nu_{hb}$ von 1,1 GHz. (b) Reflexionsbild der Probe (Kantenlänge $\sim 16 \mu\text{m}$), das einzelne, verteilte Körnchen des dotierten Materials zeigt. (c) Zugehöriges Fluoreszenzbild (mit Langpassfilter OG590 detektiert). Die Anregungsspektren wurden an der mit dem Pfeil markierten Stelle aufgenommen.

Bei den untersuchten Proben aus der Arbeitsgruppe von Prof. Behrens (Universität Hannover) wurden die Terrylen-Moleküle direkt bei der Synthese zugegeben und sind damit in den Tensiden eingebettet. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, durch Ausheizen bei $600 \text{ }^\circ\text{C}$ die Tenside nachträglich zu entfernen und damit eigentlich erst die leeren Poren zu erzeugen. Die SiO_2 -Gerüste bleiben dabei erhalten (mit Ausnahme von MCM-50, bei dem die Struktur zerstört wird) und können aus der Gasphase oder aus der Lösung neu mit Farbstoffen beladen werden. Mit einer Länge von $\sim 14 \text{ \AA}$ kann Terrylen in jeder Orientierung in den Poren eingelagert sein.

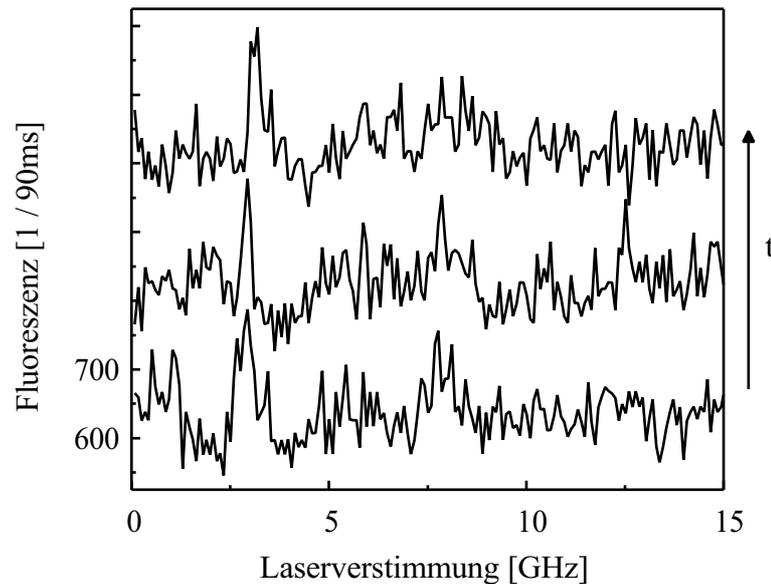


Abbildung 6.12: Fluoreszenzanregungsspektren einzelner Terrylen-Moleküle, die mit den Tensiden in die Kanalstrukturen von MCM-41 eingelagert sind ($T = 1,4 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ W/cm}^2$, $0 \text{ GHz} \equiv 571,11 \text{ nm}$). Die Spektren wurden aufeinanderfolgend ca. alle 30 s gestartet. Die Probenkonzentration war gegenüber optimalen Verhältnissen zu hoch und erklärt den hohen Untergrund.

In der MCM-48 Probe konnten nach mehreren Versuchen zur geeigneten Probenpräparation und -halterung Fluoreszenzanregungsspektren einzelner Te-Moleküle bei tiefen Temperaturen detektiert werden. In Abb. 6.10 ist ein Zyklus von sechs in Folge aufgenommener Spektren dargestellt, die die spektrale Dynamik der Moleküle zeigen. In Abb. 6.11 ist ein weiteres Beispiel von Fluoreszenzanregungsspektren mit höherer spektraler Auflösung zusammen mit dem Reflexions- und Fluoreszenzbild der Probe abgebildet, das an einer neu präparierten Probe aufgenommen wurde. Trotz möglichst geringer Anregungsintensität zeigen die Moleküle starke spektrale Diffusion, die wohl mit der zusätzlichen Einbettung in die Tenside erklärt werden muss. Die Linienbreiten von einzelnen Molekülen lagen meist über 0,3 GHz.

Auch in MCM-41 konnten Absorptionslinien einzelner Chromophore detektiert werden, allerdings mit schlechterem Signal-zu-Untergrund Verhältnis, da die Farbstoffkonzentration sehr hoch war (Abb. 6.12). Die Probe von Te in MCM-50 war noch höher konzentriert, so dass nur spektrale Lochbrennexperimente zum Test schmalbandiger Absorption durchgeführt werden konnten. Gegenüber den beiden anderen Proben war mehr Leistung zum Brennen von Löchern mit typischerweise 20 % relativer Fluoreszenzabnahme nötig. Dies kann an einer regelmäßigeren Anordnung der Tensidketten in geordneten Schichten und der damit stabileren Farbstoffumgebun-

gen liegen. Es ergaben sich durch die höhere Leistung aber auch breitere Löcher mit Halbwertsbreiten bei 2 GHz. Der Effekt der polaren Kopfgruppen kann ohne weitere Vergleichsproben nicht eingeschätzt werden.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei geeigneter Probenkonzentration auch in diesen komplexen Porensystemen Einzelmolekülspektroskopie möglich ist. Systematische Untersuchungen an den vorhandenen Proben scheinen nicht weiter sinnvoll, weil der Einfluss der Tenside, mit denen die Poren noch gefüllt waren, die Effekte des anorganische Wirtsmaterials störend überlagerte.

6.4.2 Pentacen in Perhydrotriphenylen

Neben den bisher dargestellten Systemen wurden Einschlussverbindungen des Trägermaterials Perhydrotriphenylen (PHTP) untersucht [182, 183]. PHTP bildet Einkristalle mit kolinearen, unpolaren Kanälen, deren Durchmesser $\sim 5 \text{ \AA}$ groß sind.

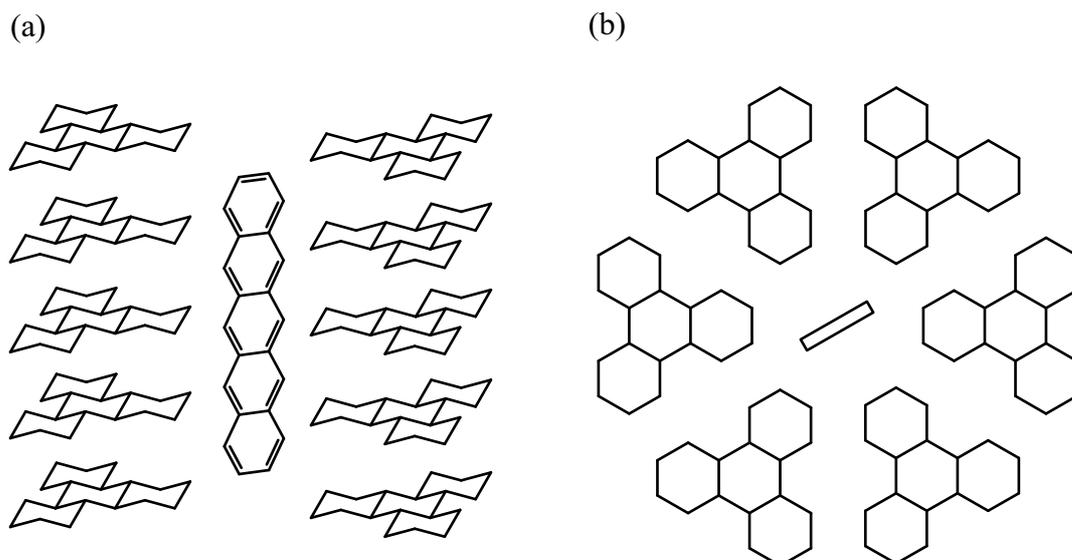


Abbildung 6.13: Struktur von PHTP mit eingelagertem Pentacen in (a) Seitenansicht und (b) Aufsicht bezüglich der Kanalrichtung.

Es wurde in dotierter Form bereits erfolgreich als Material mit nichtlinear-optischen Eigenschaften eingesetzt, indem Moleküle mit hohen Hyperpolarisierbarkeiten orientiert eingebaut wurden. Die Kristallstruktur ist nur stabil, wenn die Kanäle mit geeigneten Gastmolekülen gefüllt sind. Die Gäste müssen direkt beim Kristallisationsprozess eingebaut werden. Als passendes Farbstoffmolekül wurde Pentacen (Pc) ausgewählt, da es eine geeignete Größe hat und sich für Tieftemperaturexperimente

eignet. Um zu niedrigeren Konzentrationen zu gelangen, wurden zusätzlich noch andere, nicht im sichtbaren Spektralbereich fluoreszierende Moleküle eingebaut. Nach ersten Versuchen unter Verwendung von *p*-Terphenyl (pTp) als zusätzlichem Einschlussmaterial wurde auf Alkane und Dimethylbiphenyl (DMBP) übergegangen, um die Bildung von Pc-dotierten *p*-Terphenyl-Kristallen zu vermeiden. Die Struktur von PHTP mit eingelagertem Pc ist in Abb. 6.13 dargestellt.

Die Proben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Hulliger (Universität Bern) durch Kristallisation zwischen zwei Glasplättchen aus der Schmelze hergestellt. Die optische Qualität ist ausreichend und aufgrund einer Dicke von wenigen μm ist die Probe transparent, jedoch nicht von homogener Struktur, sondern bestehend aus vielen verschiedenen, kristallinen und materialfreien Bereichen. In ersten Untersuchungen an Proben von Pc und pTp in PHTP wurden tatsächlich Absorptionslinien einzelner Pc-Moleküle bei 1,4 K in Fluoreszenzanregungsspektren beobachtet. Da solche Linien aber nur im Bereich der Absorptionssites O_1 und O_2 von Pc / pTp bei der Wellenlänge von 592 nm auftraten, muss es sich um eine dotierte Kristallisation von pTp handeln. Die Linien waren zwar entsprechend der geringen, maximal erreichbaren Fluoreszenzzählrate von Pc mit 8000 C/s in Sättigung [17] relativ schwach, bestätigen aber zumindest die ordnungsgemäße Funktion der Apparatur.

Um den Absorptionsbereich von Pc / PHTP zu bestimmen, wurde deshalb zunächst ein Fluoreszenzanregungsspektrum einer hoch konzentrierten Probe von Pc / PHTP bei 1,4 K aufgenommen. Das Anregungsspektrum zeigt keine schmale Absorptionslinie im Bereich des 0-0 Übergangs und auch keine scharfen Absorptionssites wie z.B. Pc in pTp. Die inhomogene Verbreiterung mit der Halbwertsbreite von ~ 5 nm lässt deshalb keine Rückschlüsse auf exakt definierte Einbaulagen zu (zum Vergleich: die Halbwertsbreiten der Sites von Te / pTp sind in der Größe von $10 \text{ GHz} \equiv 0,01 \text{ nm}$ [129]). Ein Großteil der kurzwelligen Maxima, die im Abstand von 279, 615, 764, 1176 und 1521 cm^{-1} vom 0-0 Übergang auftreten, kann Schwingungen des Pc zugeordnet werden [184], obgleich die Intensitätsverhältnisse ungewöhnlich erscheinen. Absorptionslinien einzelner Pc-Moleküle sind demnach zwischen 586 und 590 nm zu erwarten.

Trotz zahlreicher Versuche gelang es in keiner der untersuchten Proben, Anregungsspektren einzelner Pc-Moleküle zu detektieren. Die Versuche, spektrale Löcher an höher konzentrierten Stellen oder bei größeren Anregungsvolumina zu brennen, führten nicht immer zum Erfolg. An geeigneten Proben und Probenstellen konnten im langwelligen Bereich der 0-0 Bande mit relativ hohen Leistungen spektrale Löcher gebrannt werden. Die relative Fluoreszenzabnahme im Zentrum der Löcher war nur wenige Prozent und sie hatten eine Breite im GHz-Bereich (siehe Abb. 6.15 d).

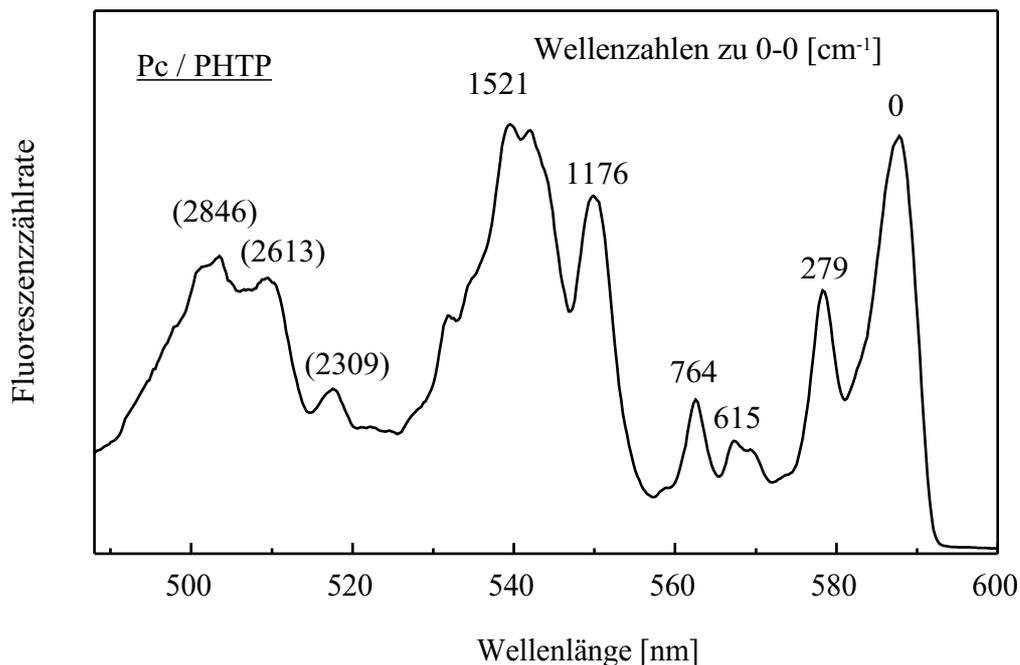


Abbildung 6.14: Fluoreszenzanregungsspektrum von Pc in PHTP bei 1,4 K (korrigiert bzgl. der Linien der Xe-Lampe, Detektion der Fluoreszenz nach RG630, Auflösung 10 cm^{-1}). Das langwelligste Maximum bei 587,8 nm kann dem 0-0 Übergang zugeordnet werden, der eine Halbwertsbreite von $\sim 5 \text{ nm}$ hat. Die meisten der anderen Maxima (Abstand zu 0-0 in cm^{-1} angegeben) können typischen Schwingungen von Pc zugeordnet werden (typische Schwingungen sind ohne Klammern angegeben).

Zur Illustration der Probenqualität ist in Abb. 6.15 ein Reflexionsbild eines Probenbereichs von $130 \mu\text{m}$ abgebildet. Es zeigt mehrere, unterschiedlich reflektierende Zonen. Zusätzlich sind zwei Fluoreszenzbilder dargestellt, die mit 90° zueinander verdrehter Polarisation und einer Anregungswellenlänge von 588,8 nm bei 4 K aufgenommen wurden. Viele reflektierende Bereiche zeigen überhaupt keine Fluoreszenz, manche zeigen sie bei beiden Polarisationsrichtungen. Die großen Bereiche im unteren Drittel der Bilder zeigen das Verhalten, das von Pc in PHTP erwartet wird, nämlich eine Polarisationsabhängigkeit der Fluoreszenz aufgrund der orientierten Einlagerung in die Kanäle. Auch in diesen Bereichen wurde erfolglos versucht, einzelne Moleküle zu detektieren.

Aus den bisherigen Ergebnissen ist abzuleiten, dass die Probenqualität zur Einzelmoleküldetektion in diesen Kanalsystemen noch deutlich verbessert werden muss, um die Aussichten auf Erfolg zu steigern. Starke Beeinträchtigungen sind jedoch auch in der Verwendung des hinsichtlich seiner photophysikalischen Eigenschaften nicht optimalen Farbstoffs Pc zu sehen. Die geringe Lochbrenneffizienz kann zwar

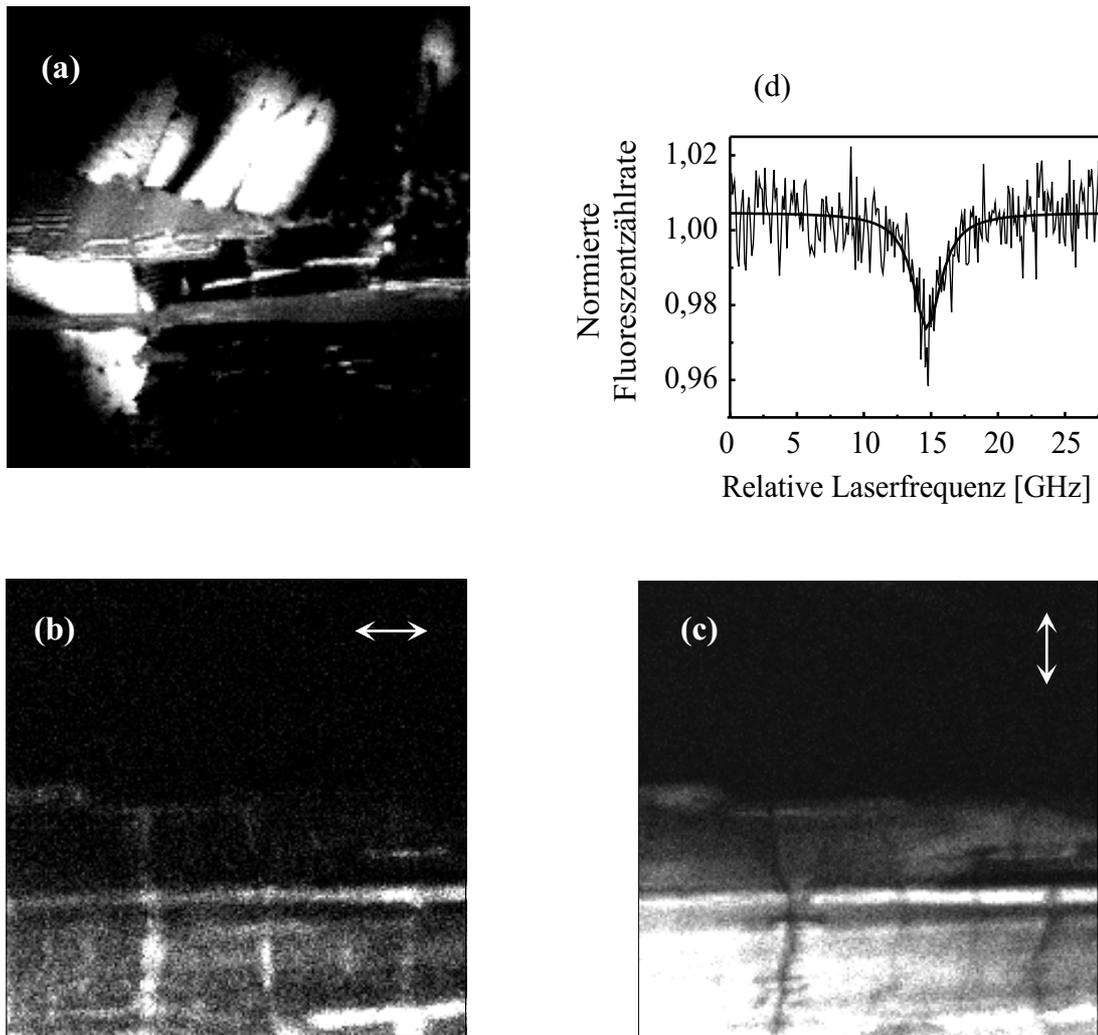


Abbildung 6.15: (a) Reflexionsbild einer Probe von Pc und DMBP (1:1000) in PHTP bei 4 K (Kantenlänge $\sim 130 \mu\text{m}$). (b,c) Fluoreszenzbilder desselben Bereichs wie in a mit zueinander orthogonaler Polarisationsrichtung ($\lambda_{exc} = 588,84 \text{ nm}$, $I = 50 \text{ W/cm}^2$, Filter: DC595, RG630). (d) Normiertes Lochspektrum, aufgenommen an einer anderen Probe ($T = 1,4 \text{ K}$, $0 \text{ GHz} \equiv 588,79 \text{ nm}$, $I = 0,1 \text{ W/cm}^2$, Brennen: 5 min mit $0,5 \text{ kW/cm}^2$). Der Lorentzfit (durchgezogene Linie) hat eine Halbwertsbreite von 2,5 GHz.

mit einer stabilen Einbaulage in Verbindung gebracht werden, das vorhandene Bulk-Anregungsspektrum deutet jedoch darauf hin, dass die Linienbreite von Pc in PHTP deutlich erhöht ist. Zudem erlaubt Pc wegen der ungünstigen Triplettraten im Vergleich zu Terrylen oder TDI nur sehr geringe Fluoreszenzzählraten. Die anderen für Tieftemperatur tauglichen Farbstoffe lassen sich aber wegen ihrer Größe nicht in diese Matrix einlagern. Es erscheint sinnvoll, bei niedrigeren Konzentrationen andere Farbstoffe zu verwenden und diese bei Raumtemperatur räumlich zu selektieren.

Damit verlagert sich zwar das Problem, geeignete Proben mit der richtigen Konzentration herzustellen, man ist jedoch in der Wahl der Farbstoffe flexibel und nicht mehr vom schwach fluoreszierenden Pc und schmalen Absorptionslinien abhängig.

6.5 Einzelmolekülspektroskopie an biologischen Proben

Die Technik der Einzelmoleküldetektion ist eine besonders geeignete Methode zur Untersuchung biologischer Systeme. Dies liegt einerseits an der hohen Sensitivität dieser Technik, die es in der Analytik erlaubt, als ultimatives Limit einzelne Moleküle nachzuweisen. Herausragende Beispiele sind analytische Erkennung einzelner fluoreszenzmarkierter Antigene [185] oder die Beobachtung von Diffusion in Lipidmembranen [59] oder von Diffusion einzelner Viren [186]. Andererseits kann mit der Einzelmolekülspektroskopie die große Heterogenität dieser komplexen Systeme aufgebrochen werden. Biologischen Systeme sind allgemein Makromoleküle, die in den unterschiedlichsten Konformationen auftreten können und zwischen diesen unkorreliert fluktuieren. Während im Ensemble nur ein Mittelwert über alle Konformationen beobachtbar ist, erlaubt die Untersuchung eines einzelnen Moleküls die Verfolgung der individuellen, momentanen Konformation. Als wichtige Experimente können hier die Erforschung von Enzymaktivitäten [61] oder die Aufklärung von photo-physikalischen Vorgängen wie Energie- und Ladungstransferreaktionen [33] genannt werden.

Für viele Experimente müssen die biologischen Substanzen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, da sie selbst nicht fluoreszieren. Es treten in der Natur jedoch auch Zellbestandteile auf, in denen Farbstoffe auf natürliche Weise eingebaut sind. Dazu zählen das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) und die Proteine der Lichtsammelkomplexe in den photosynthetischen Apparaten von Bakterien und Pflanzen.

Die im Folgenden vorgestellten ersten Untersuchungen an biologischen Proben wurden an GFP und an Proteinen aus dem Lichtsammelkomplex von Cyanobakterien durchgeführt. Ziel der Experimente war zunächst die Isolation einzelner Chromophore und im Weiteren die Untersuchung der Proteindynamik über die zeitliche und spektrale Entwicklung der Fluoreszenz. Die Experimente wurden bei kryogenen Temperaturen durchgeführt. Der Vorteil der Tieftemperaturtechnik liegt dabei in der reduzierten Dynamik und der Unterdrückung von Photobleichprozessen. Viele bei Raumtemperatur aktivierte Prozesse können eingefroren werden, um grundlegende Reaktionen zu beobachten. Man stabilisiert eine bestimmte Konformation, um

sie detailliert und ohne Mittelungsprozesse studieren zu können. In Ergänzung wurden und werden im Arbeitskreis auch Experimente bei Raumtemperatur an diesen Systemen durchgeführt. Dass die Anwendung tiefer Temperaturen in Untersuchungen biologischer Systeme durchaus sinnvoll ist, belegen Experimente an einzelnen Lichtsammelkomplexen LH II des photosynthetischen Systems von Purpurbakterien [187, 33]. Dabei wurden interessante Beobachtungen zur unterschiedlichen Kopplung der beiden ringförmigen Chromophor-(Chlorophyll a)-Anordnungen durch die Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren gemacht.

Probleme ergeben sich bei biologischen Systemen allgemein durch erhöhte Untergrundbeiträge, die durch Verunreinigungen und höhere Streukoeffizienten entstehen. Außerdem fluoreszieren die natürlichen Chromophore im Allgemeinen schlechter als chemisch optimierte Farbstoffe (da sie in der Natur häufig nicht die Aufgabe haben, zu fluoreszieren, sondern Energie zu absorbieren und strahlungslos zu transferieren). Die Stabilisierung ausgewählter Zustände bei tiefen Temperaturen kann ebenfalls negative Effekte haben, wenn gerade Dunkelzustände, die photochemisch erzeugt wurden, lange leben und die Fluoreszenzzählrate stark erniedrigen.

In den folgenden zwei Abschnitten wird auf Untersuchungen am Grün Fluoreszierenden Protein und am Phycoerythrocyanin, einem Protein aus dem Lichtsammelkomplex von Cyanobakterien oder Rotalgen, eingegangen. Bei beiden Systemen gelang es, einzelne Proteine zu detektieren.

6.5.1 Grün Fluoreszierendes Protein

Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) tritt in der Quallenart *Aequorea victoria* auf und ist eines der in letzter Zeit am häufigsten studierten Proteine [188]. Es besteht aus 238 Aminosäuren [189], von denen Ser65 (Serin, S, an Pos. 65), Tyr66 (Tyrosin, Y) und Gly67 (Glycin, G) durch autokatalytische Zyklisierung und Dehydrierung den Chromophor bilden (siehe Abb. 4.15 und 6.16), und kann in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen exprimiert werden [190]. Daraus ergibt sich das große Interesse an GFP als natürlicher Fluoreszenzmarker. Das Molekül weist eine fassartige Struktur aus elf Strängen von β -Faltblättern mit überlappenden α -Helizes auf [191, 192]. In einer inneren α -Helix ist der Fluorophor geschützt eingebaut (siehe Abb. 6. 16) und wird durch mehrere polare Aminogruppen und eingebundenes Wasser stabilisiert (siehe Abb. 4.15).

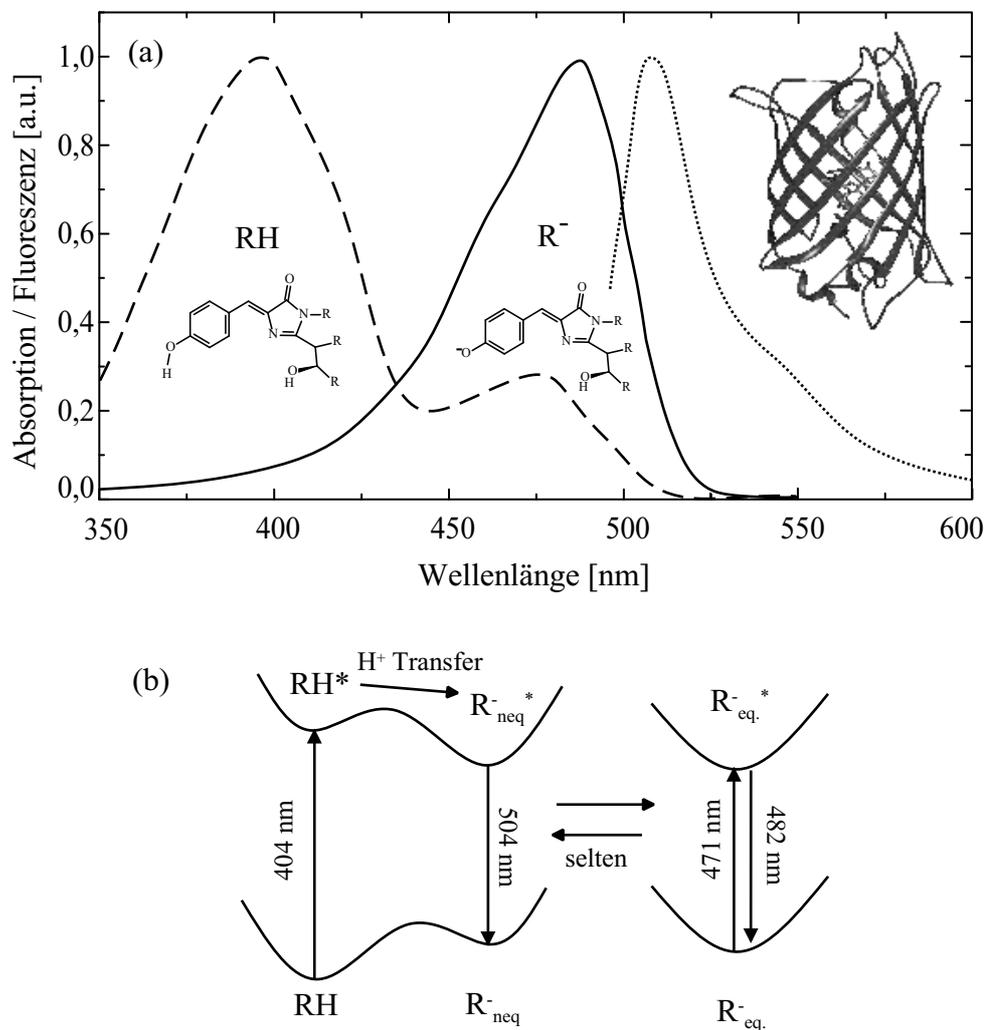


Abbildung 6.16: (a) Absorptionsspektrum von wt-GFP (gestrichelt) [197] und von EGFP (durchgezogene Linie, nur schematisches Spektrum für GFP Mutanten der Klasse 2 nach [188]), sowie das Fluoreszenzspektrum (gepunktet), das für beide Proteinformen sehr ähnlich ist (ebenfalls nur schematisch nach [188]). Die unterschiedlichen Absorptionsbanden treten für den Chromophor im neutralen bzw. anionischen Zustand auf. Fluoreszenz entsteht immer aus einem anionischen Zustand (gegebenenfalls nach Protonentransfer). Außerdem ist die räumliche Struktur von GFP mit dem Chromophor im Zentrum dargestellt. (b) Potentialschema für wt-GFP, das den Protonentransfer im angeregten Zustand zeigt und die Spektren erklärt. Übergänge in die anionische Gleichgewichtslage und zurück sind möglich und können als Bleichprozesse interpretiert werden (aus [201]).

Spektrale Eigenschaften

GFP des Wild-Typs (wt-GFP) zeigt eine charakteristische Doppelabsorption bei ~ 400 nm und ~ 475 nm (siehe Abb. 6.16). Durch Röntgenstrukturuntersuchungen [193] und Ultrakurzzeitspektroskopie [194, 195] konnten die kurzwellige Absorption der neutralen Form des Chromophors RH und die langwellige Absorption der anionischen Form R_{eq}^- (*equilibriert*, im Gleichgewicht) zugeordnet werden. Das Intensitätsverhältnis der beiden Banden ist vom pH-Wert abhängig. Fluoreszenz tritt nur im langwelligen Bereich um 505 nm auf, da beim neutralen Chromophor im angeregten Zustand RH^* ein Protonentransfer stattfindet und eine anionische, nicht-equilibrierte Form R_{neq}^-* des Chromophors emittiert. Nach Reprotonierung liegt der Chromophor wieder im neutralen Zustand vor. Es findet auch eine reversible (Photo) Konversion zwischen der neutralen Form RH und der equilibrierten anionischen Form R_{eq}^- statt (über R_{neq}^-* , siehe Abb. 6.16 b).

Mittlerweile konnte eine große Anzahl von Mutanten hergestellt werden, die nach Tsien [188] in mehrere Gruppen eingeteilt werden können. Sie entstehen durch site-spezifische Mutationen, bei denen einzelne Aminogruppen in der direkten Farbstoffumgebung ersetzt werden. Die veränderte Polarität führt dabei zu einer Änderung der relativen Stabilität der neutralen (RH) bzw. anionischen (R_{eq}^-) Form. Damit bietet sich die Möglichkeit, die Fluoreszenzeigenschaften für spezielle Anforderungen zu optimieren. Gleichzeitig können photochemische Eigenschaften durch den Vergleich verschiedener Mutanten strukturell zugeordnet werden. Neben dem Gleichgewicht zwischen der anionischen und der neutralen Form des Chromophors können auch die spektralen Lagen der Banden im Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des GFP durch Mutationen verschoben werden. So ist inzwischen auch eine rot fluoreszierende Mutante erhältlich [196].

In den hier beschriebenen Experimenten wurde wt-GFP, sowie die anionisch stabilisierte Mutante EGFP (enhanced GFP, *Clontech*; F64L, S65T) verwendet. Das Absorptionsspektrum von wt-GFP ist in Abb. 6.16 gestrichelt dargestellt. Es zeigt die Bande bei ~ 400 nm für RH-Absorption und die etwas schwächere Bande bei ~ 475 nm für R_{eq}^- -Absorption. Bei Mutanten der Klasse 2, zu der EGFP mit Absorptionsmaximum bei 488 nm zählt, ist das Gleichgewicht stark zugunsten der anionischen Form verlagert und im Spektrum tritt im Wesentlichen die R_{eq}^- -Bande auf (Abb. 6.16, durchgezogene Linie). Das Fluoreszenzmaximum von wt-GFP liegt bei 504 nm, das von EGFP bei 508 nm.

Einzelmolekülexperimente bei Raumtemperatur

Die ersten Experimente an einzelnen GFP-Molekülen bei Raumtemperatur und Anregung der anionischen Form zeigen starkes Blinken und hohe Photobleichraten [198, 60, 199], was wegen des geschützten und stabilisierten Einbaus des Chromophors in das Protein zunächst unerwartet ist. Einzelmolekülexperimente ermöglichen die direkte Beobachtung dieser Prozesse und können zur Erklärung beitragen. Dickson und Mitarbeiter [60] erkannten, dass die Fluoreszenz nach dem Bleichen durch Einstrahlung von 405 nm zurückgewonnen werden kann, was in Fluoreszenzkorrelationsexperimenten von G. Jung [197] bestätigt werden konnte. In diesen Experimenten wurden Dunkelzustände auf verschiedensten Zeitskalen beobachtet, im ms-Bereich, aber auch mit Lebenszeiten von Sekunden und sogar Stunden [199, 200]. Neben der Protonentransferreaktion ist die Fluoreszenzdynamik auch durch die Kopplung an die umgebende Proteinmatrix bestimmt. Um die Proteindynamik verstehen zu können, müssen die auftretenden Prozesse durch kombinierte Untersuchung von dynamischen Parametern, spektralen Eigenschaften und strukturellen Elementen in Einzelmolekülexperimenten identifiziert werden.

Bulkexperimente bei Tieftemperatur

Beim Abkühlen auf 1,6 K verschmälert sich das Absorptionsspektrum (von wt-GFP) geringfügig und das Maximum der langwelligen Bande verschiebt sich um wenige nm kurzwellig zu 471 nm. Das Brennen schmaler, spektraler Löcher gelingt nur an wenigen Stellen der Bande. Aus apparativen Gründen konnte bisher nur eine obere Grenze der Lochbreite mit ~ 50 GHz bestimmt werden [201, 202]. Akzeptiert man die in [202] angegebene Elektron-Phonon-Kopplungsstärke von $S = 4$, so ergibt sich ein Debye-Waller-Faktor (Verhältnis der Intensität der Nullphononenlinie zur Gesamtintensität) von $\alpha_D = e^{-S}$ von $\approx \frac{1}{50}$ und damit eine extrem schwache Nullphononenlinie [74]. Für Einzelmolekülexperimente ist das ein erheblicher Nachteil, da schwache und breite Linien zu einem schlechten Signal-zu-Untergrund Verhältnis führen. In Ensembleexperimenten an wt-GFP bei Tieftemperatur konnte auch gezeigt werden, dass eine Reihe von Zuständen, die unterschiedlichen Proteinkonformationen zugeschrieben werden müssen, eingefroren werden können und bis Temperaturen um 100 K stabil bleiben [201]. Tritt ein Übergang in einen dieser Zustände auf, entspricht das dem Bleichen des Moleküls für die Bestrahlung mit der ursprünglichen Anregungswellenlänge und dem Ende des Experiments an diesem Molekül. In Abb. 6.17 ist das erweiterte Potentialschema dargestellt, in dem die neuen Zustände zusätzlich eingezeichnet sind.

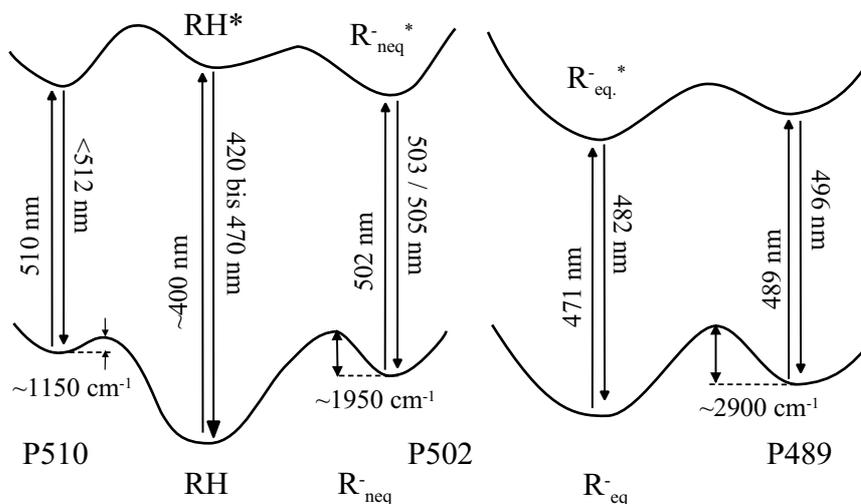


Abbildung 6.17: Erweitertes Potentialschema für wt-GFP nach [201] mit den drei Photoproduktzuständen. Bei Anregung der equilibrierten Form R_{eq}^- ist ein Bleichen in den Produktzustand P489 möglich.

Einzelmolekülexperimente bei Tieftemperatur

In den eigenen Experimenten gelang es, einzelne Moleküle des Wild-Typs in wässriger (mit Puffer pH 10) Agarosematrix [203] räumlich zu isolieren und zu detektieren. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 476,5 nm und führte zu störendem Streuuntergrund bei geringen Fluoreszenzzählraten. Die Moleküle zeigten wenig Dynamik und bleichten nach wenigen Sekunden in einen Dunkelzustand, aus dem sie innerhalb von 20 min nicht mehr zurückkehrten. Nach [201] kann der Chromophor in einem photoinduzierten Produktzustand übergehen, der bei 489 nm absorbiert und dessen Barrierenhöhe 132 K entspricht. Damit kann der Zustand bei den experimentellen Temperaturen thermisch nicht entvölkert werden und der Chromophor kehrt nicht wieder zur ursprünglichen Anregung und Fluoreszenz zurück. Durch Einstrahlung einer zweiten Farbe könnte der Chromophor möglicherweise wieder zur Fluoreszenz aktiviert werden, zunächst wurde jedoch die Mutante gewechselt.

Für weitere Versuche wurde EGFP verwendet. Zur Vermeidung von Aggregationen wurde statt eines Gels die Standardmatrix für Lochbrennexperimente an Proteinen, eine Glycerin-Wasser(Puffer)-Mischung (3:1), verwendet. Die Anregung erfolgte wieder mit 476,5 nm und es wurde der dichroitische Strahlteiler DC460 und ein Bandpassfilter (meist BP510-50) verwendet. Auch hier gelang es, einzelne Moleküle zu detektieren. Dass es sich tatsächlich um einzelne Moleküle handelt, wurde aus der Intensitätsänderung in den Bildern für die Verdünnungsschritte, aus der erwarteten Molekülzahl und aus dem stufenweisen Ausbleichen in den Zeitspuren abgeleitet.

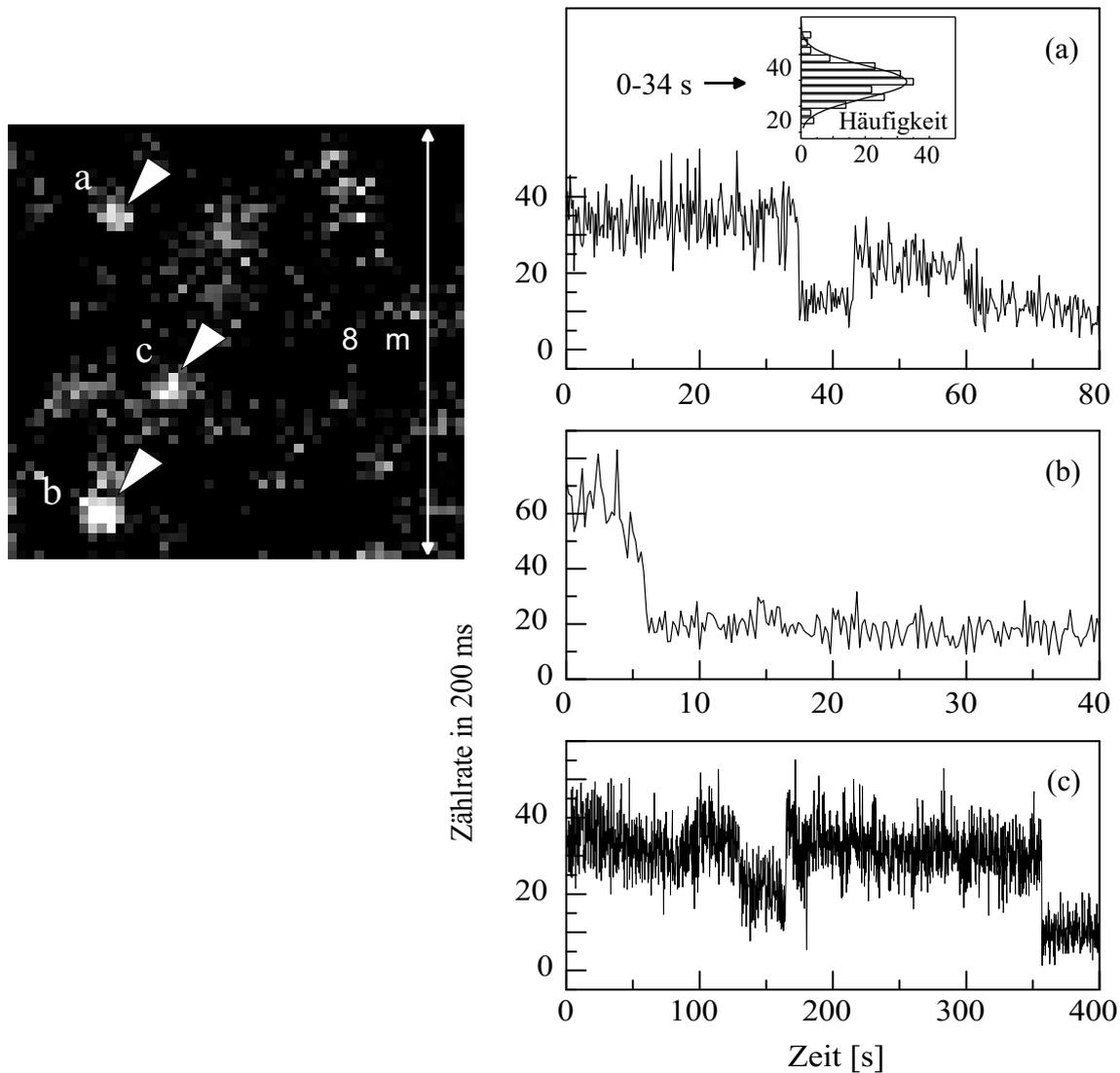


Abbildung 6.18: Fluoreszenzbild von EGFP in Glycerin/Wasser ($T = 160$ K, $\lambda_{exc} = 476,5$ nm, $I = 0,5$ kW/cm², Kantenlänge $8 \mu\text{m}$). (a-c) Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität bei kontinuierlicher Bestrahlung der einzelnen, markierten Moleküle. Der Einsatz in (a) zeigt, dass das während der ersten 34 s auftretende Rauschen nicht durch Proteindynamik verursacht ist, sondern von statistischen Fluktuationen gemäß der Poisson-Statistik stammt (mittlere Zählrate: 34,4 C/200ms, Standardabweichung: 6,3 C/200ms). Die unterschiedlichen Signalintensitäten innerhalb einer Zeitspur können durch spektrale Shifts erklärt werden. Dabei ändert sich die Konformation des Proteins in einen definierten neuen Zustand, der eine anderes Absorptionsmaximum hat und deshalb an einer anderen Stelle der Bande mit anderer Intensität angeregt wird.

Dass es sich auch um EGFP und keine, bei blauer Anregung fluoreszierenden Verunreinigungen handelt, wurde aus Fluoreszenzspektren gefolgert, die jedoch nur bei Integration der Zählrate für einen Scan über ein ganzes Bild aufgenommen werden konnten. In Abb. 6.18 ist ein Fluoreszenzbild und drei Fluoreszenzzeitspuren abgebildet, die bei 160 K detektiert wurden.

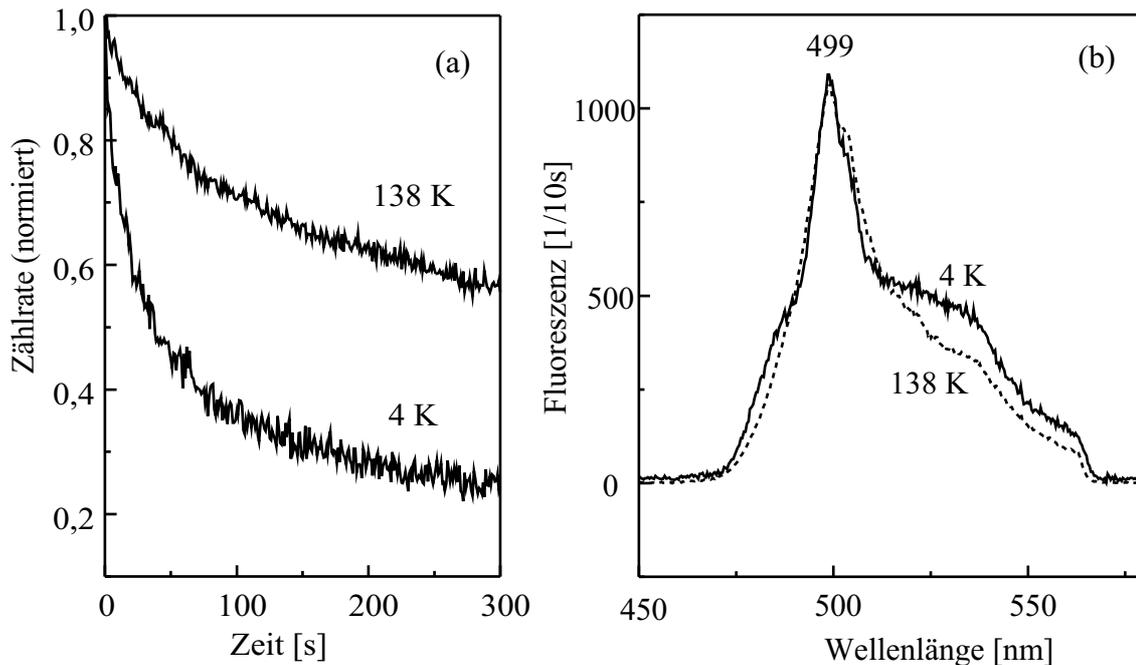


Abbildung 6.19: (a) Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz bei Bestrahlung einer hoch konzentrierten Probe von EGFP in Glycerin/Wasser bei zwei verschiedenen Temperaturen ($\lambda_{exc} = 476,5 \text{ nm}$, $I = 2,5 \text{ kW/cm}^2$). Die Moleküle bleichen bei 4 K deutlich schneller als bei 138 K. Da die Anregungsintensität wegen der starken Fokussierung im Mikroskop inhomogen ist, entspricht die Kurve nicht einer einfachen Exponentialfunktion. (b) Fluoreszenzspektren der Probe von a bei zwei verschiedenen Temperaturen, die aus drei Spektren unter Verwendung von Bandpassfiltern (BP485-50, BP510-50, BP535-55) detektiert wurden. Die Ränder der Spektren sind durch die Filter möglicherweise abgeschnitten. Der Hauptpeak wird bei 4 K kaum schmaler, eine Nullphononenlinie (oder FLN) ist nicht zu erkennen, statt dessen bildet sich eine Schulter bei 530 nm, die möglicherweise Fluoreszenz aus einem mitangeregten Produktzustand ist.

Die maximal erreichten Fluoreszenzzählraten betragen nur 250 C/s. Die geringen Zählraten erlauben damit auch nur eine zeitliche Auflösung im Bereich von 0,1 Sekunden. Die Zeitspuren zeigen wenig Dynamik, so dass keine statistische Auswertung zur Bestimmung von Raten möglich ist. Sie zeigen sprunghafte Intensitätsänderungen und irreversibles Ausbleichen. Die Intensitätsschwankungen können mit spektralen Shifts erklärt werden, die durch eine definierte Änderung der Proteinkonformation verursacht sind. Für Moleküle mit längeren Fluoreszenzphasen vor dem

Ausbleichen könnte aus den Zeitspuren oder durch Aufnahme der Fluoreszenzintensitäts-Autokorrelationsfunktion die Dynamik der Konformationsänderungen näher charakterisiert werden und Raten zwischen den Zuständen ermittelt werden. Die bisher bestimmten Daten sind aber noch nicht ausreichend für weitere Aussagen. Der Einsatz spektraler Auflösung erscheint nach den Lochbrennexperimenten wenig aussichtsreich. Einzelne Moleküle bei 4 K zu detektieren gelang weder in dieser Probe noch in anderen EGFP Proben, weil wahrscheinlich der Übergang in den Dunkelzustand sehr effizient ist. Inzwischen ist auch bei dieser Mutante ein Produktzustand bei Einstrahlung mit 476,5 nm bekannt. Dieser absorbiert bei ~ 528 nm und ist bis ca. 85 K stabil [204].

Die aufgetretenen Probleme der geringen Zählrate, der starken Elektron-Phonon-Kopplung und des raschen Bleichens in Dunkelzustände sollen durch einige Ensembleexperimente abschließend noch veranschaulicht werden. In Abb. 6.19 (a) ist die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz bei Einstrahlung in eine hoch konzentrierte Probe von EGFP in Glyzerin/Wasser für zwei verschiedene Temperaturen dargestellt (aufgenommen mit dem mikroskopischen Aufbau). Man erkennt, dass die Bleichrate bei tieferen Temperaturen deutlich zunimmt. Dabei entsteht kein spektrales Loch, sondern eine Reduzierung der ganzen Bande. In Abb. 6.19 (b) ist der Effekt der Temperaturerniedrigung auf das Fluoreszenzspektrum dargestellt. Es zeigt sich keine Fluoreszenzlinienverschmälerung und keine Nullphononenlinie, der Hauptpeak bei 499 nm wird nur geringfügig schmaler. Die Ursache liegt wohl in starker Elektron-Phonon-Kopplung des in sich flexiblen Chromophors. Außerdem bildet sich bei 530 nm eine Schulter im Fluoreszenzspektrum, die dem bei 4 K thermisch stabilen Produktzustand zugeordnet werden muss.

Die Einzelmoleküluntersuchungen wurden zunächst ausgesetzt, bis aus Ensembleuntersuchungen an dieser und anderen Mutanten neue Informationen gewonnen worden sind. Die Detektion einzelner GFP-Moleküle ist schon bei Raumtemperatur höchst anspruchsvoll und liefert nur eine geringe Anzahl an Fluoreszenzphotonen. Bei tiefen Temperaturen erreicht man keine zusätzliche Stabilität des fluoreszierenden Zustands, sondern erzeugt einen stabilen Produktzustand bei einer anderen Absorptionswellenlänge. In den Experimenten ist es gelungen, einzelne Moleküle zu detektieren, quantitative Aussagen sind aber vorerst nicht möglich. Eine Möglichkeit für zukünftige Experimente ist die zusätzliche Einstrahlung von Licht einer zweiten Farbe, wie es bereits erfolgreich bei Fluoreszenzkorrelationsexperimenten bei Raumtemperatur angewendet wird [197], um den fluoreszierenden Zustand gezielt zu repopulieren. Die Verwendung einer anderen Mutante mit geringerer Bleichrate ist eine weitere Möglichkeit, die Experimente erfolgreich fortzusetzen. Systematische (Ensemble) Untersuchungen an verschiedenen Mutanten sind jedoch Voraussetzung,

um die richtige Auswahl treffen zu können.

6.5.2 Phycoerythrocyanin

Weitere Experimente wurden an Phycoerythrocyanin (PEC), sowie an einzelnen Proteinen der α -Untereinheit durchgeführt. PEC absorbiert im gelben Spektralbereich und besteht aus mehreren Untereinheiten mit mehreren Chromophoren.

Es gehört zur Gruppe der Phycobiliproteine [205], die im Lichtsammelkomplex von Cyanobakterien und Rotalgen auftreten. Aufgabe der Phycobiliproteine ist es, Energie durch Absorption von sichtbarem Licht aufzunehmen und durch effizienten Energietransfer an das photosynthetische Reaktionszentrum weiterzuleiten, an dem schließlich Ladungstrennung erfolgt. Jedes Protein dieser Gruppe besteht aus mehreren Untereinheiten, die mit α oder β bezeichnet werden. Am Proteingerüst sind jeweils ein oder mehrere offenkettige Tetrapyrrol-Chromophore angebunden, die durch unterschiedliche Konjugation innerhalb der Farbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen zwischen 490 nm und 665 nm absorbieren. Die verschiedenen Phycobiliproteine sind antennenförmig um das Reaktionszentrum (RZ) angeordnet, wobei die Absorptionswellenlänge mit abnehmender Entfernung zum RZ zunimmt: Phycoerythrin ($\lambda_{abs} \approx 495 - 565$ nm) \rightarrow Phycoerythrocyanin ($\lambda_{abs} \approx 575$ nm) \rightarrow Phycocyanin ($\lambda_{abs} \approx 615$ nm) \rightarrow Allophycocyanin ($\lambda_{abs} \approx 650$ nm).

In der Literatur wurde bereits über Ergebnisse aus Experimenten an einzelnen Phycobiliproteinen berichtet. So zeigen Phycoerythrine mit 34 Chromophoren im Proteinkomplex einstufiges Ausbleichen [70]. Dies lässt auf eine starke elektronische Kopplung zwischen allen Chromophoren schließen. Bei der Untersuchung einzelner Allophycocyanine mit 6 Chromophoren treten typischerweise 3 Stufen in den Fluoreszenzzeitkurven auf, die nur auf eine paarweise starke Kopplung hindeuten [206]. Durch die direkte Beobachtung der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenz individueller Komplexe sind bereits wesentliche Aussagen zur Kopplung zwischen den einzelnen Chromophoren möglich.

Die eigenen Untersuchungen wurden an einzelnen Phycoerythrocyanin-Proteinen durchgeführt und werden in Zukunft auch fortgesetzt. Durch die Zusammenarbeit mit Dr. A. Parbel (Arbeitsgruppe Prof. H. Scheer, Botanisches Institut der Universität München) bestand und besteht die Möglichkeit, das Trimer (siehe Abb. 6.20), das Monomer, sowie die einzelnen α - oder β -Untereinheiten von PEC aus dem Cyanobakterium *Mastigocladus laminosus* untersuchen zu können. In der α -Untereinheit ist ein Chromophor, das Phycoviolobilin, an der Stelle Cys84 verankert. Das Absorptionsmaximum der reinen α -Untereinheit liegt bei 566 nm, das Fluoreszenzmaximum

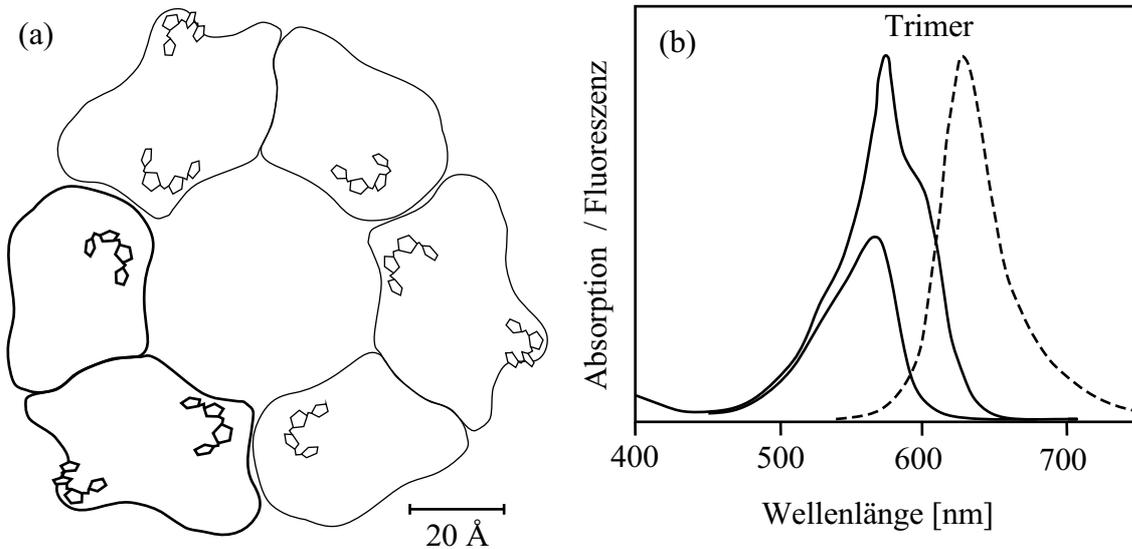


Abbildung 6.20: (a) Schematische Darstellung des Phycoerythrocyanin-Trimers. Dick gezeichnet ist ein Monomer. Neben den α - und β -Untereinheiten sind die Chromophorpositionen angedeutet. (b) Quantitative Absorptionsspektren (durchgezogenen Linien) von trimerem PEC ($\lambda_{max} \approx 575$ nm) und von der isolierten α -Untereinheit ($\lambda_{max} \approx 556$ nm), sowie das Fluoreszenzspektrum von PEC-Trimeren (gestrichelt, $\lambda_{max} \approx 625$ nm, $\lambda_{exc} = 520$ nm) (Vorbelichtung mit 500 nm, pH 7,0; nach [207]).

bei 588 nm (Raumtemperatur) [207]. Durch intensive Einstrahlung in das Maximum der Bande kann es jedoch zu einer reversiblen, photochemischen Transformation zwischen cis- und trans-Isomeren kommen. Dabei dreht sich ein Pyrrolring und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu ~ 507 nm [208]. In der β -Untereinheit sind zwei Phycocyanobilin-Chromophore kovalent an das Protein angebunden. Das Absorptionsmaximum liegt bei ~ 600 nm, die Fluoreszenz tritt um 625 nm auf [207]. Für die β -Untereinheit ist kein photoinduzierter Schaltvorgang bekannt. Eine α -Untereinheit und eine β -Untereinheit bilden ein Monomer $\alpha\beta$, drei Monomere in C_3 -symmetrischer, scheibenförmiger Anordnung bilden ein Trimer $(\alpha\beta)_3$, das damit insgesamt 9 Chromophore trägt. Das Absorptionsmaximum des Trimers liegt bei 575 nm, Fluoreszenz wird im Wesentlichen von den β -Untereinheiten um 625 nm emittiert. Der Durchmesser des Trimers ist 11 nm und die Dicke ca. 3 nm. Die Abstände der Chromophore im Monomer liegen zwischen 35 Å und 50 Å, im Trimer ist der kürzeste Abstand 21 Å [209], was effektiven Energietransfer an den am langwelligsten absorbierenden Chromophor (β) erwarten lässt.

Zunächst wurde versucht, einzelne α -Untereinheiten in einer 60 %igen Glycerin/Puffer Lösung zu detektieren. Der Farbstofflaser wurde mit Rhodamin 6G betrieben, womit eine große Flexibilität der Anregungswellenlänge im gewünschten

Bereich gegeben ist. Als optische Elemente wurden der dichroitische Strahlteiler DC595 und der Langpassfilter OG590, später der Bandpassfilter BP620-60 (Transmission 590 - 650 nm) eingesetzt. Nach mehreren Verdünnungsschritten gelang es, Fluoreszenzbilder und Zeitspuren einzelner Proteine bei tiefen Temperaturen aufzunehmen.

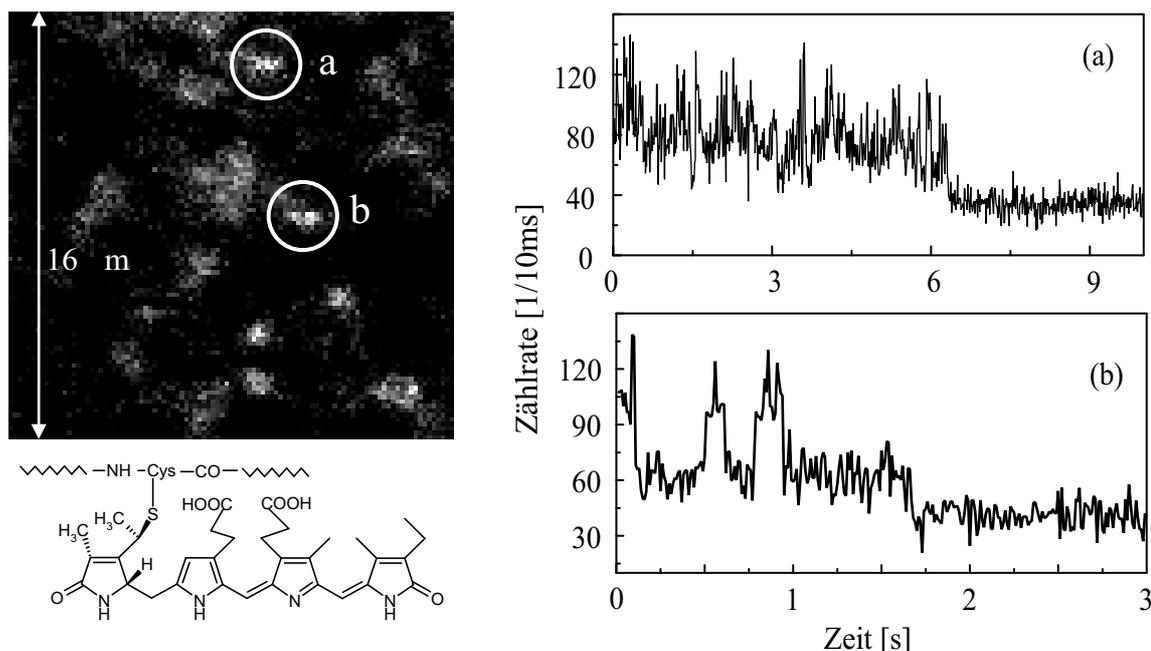


Abbildung 6.21: Fluoreszenzbild von α -Untereinheiten von PEC in Glycerin/Puffer bei 4 K. An den beiden markierten Stellen wurden die Zeitspuren (a,b) detektiert, die digitales An- und Ausschalten von Fluoreszenz zeigen und deshalb auf einzelne Moleküle hindeuten ($\lambda_{exc} = 562,0$ nm, $I = 3$ kW/cm²). Die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (besonders in b) sind durch reversible spektrale Sprünge der Absorptionslinie erklärbar. Außerdem ist die Strukturformel des Phycoviolobilin-Chromophors abgebildet.

In der Zeitspur von Molekül (a) in Abb. 6.21 ist eine starke Dynamik in der Fluoreszenzintensität sichtbar. Bei den Schwankungen um den Mittelwert während der ersten 6 s handelt sich nicht um einfaches statistisches Rauschen, da die Standardabweichung von 20 (Counts/10ms) deutlich höher als die Wurzel des Mittelwerts von 79 (Counts/10ms) ist. Bei genauerer Betrachtung kann man auch verschiedene Intensitätsniveaus in diesem Zeitbereich sehen. Dabei wurden sehr hohe Anreizleistungen von einigen W/cm² zum Erreichen der Zählrate von ~ 5000 C/s (ohne Untergrund) verwendet. Auch Molekül (b) zeigt zwei verschiedene, reversibel wechselnde Fluoreszenzintensitäten. Geht man davon aus, dass es sich nicht um ein Aggregat aus zwei oder mehreren Untereinheiten handelt, da die Lösungen stark verdünnt waren und direkt vor der Probenpräparation nochmals in einem Ul-

traschallbad behandelt wurden, so scheinen spektrale Shifts und Sprünge für die Intensitätsänderungen verantwortlich zu sein. Zur näheren Untersuchung wurde die Aufnahme von Anregungsspektren vorbereitet und währenddessen die Versuche zur Detektion einzelner Trimere begonnen.

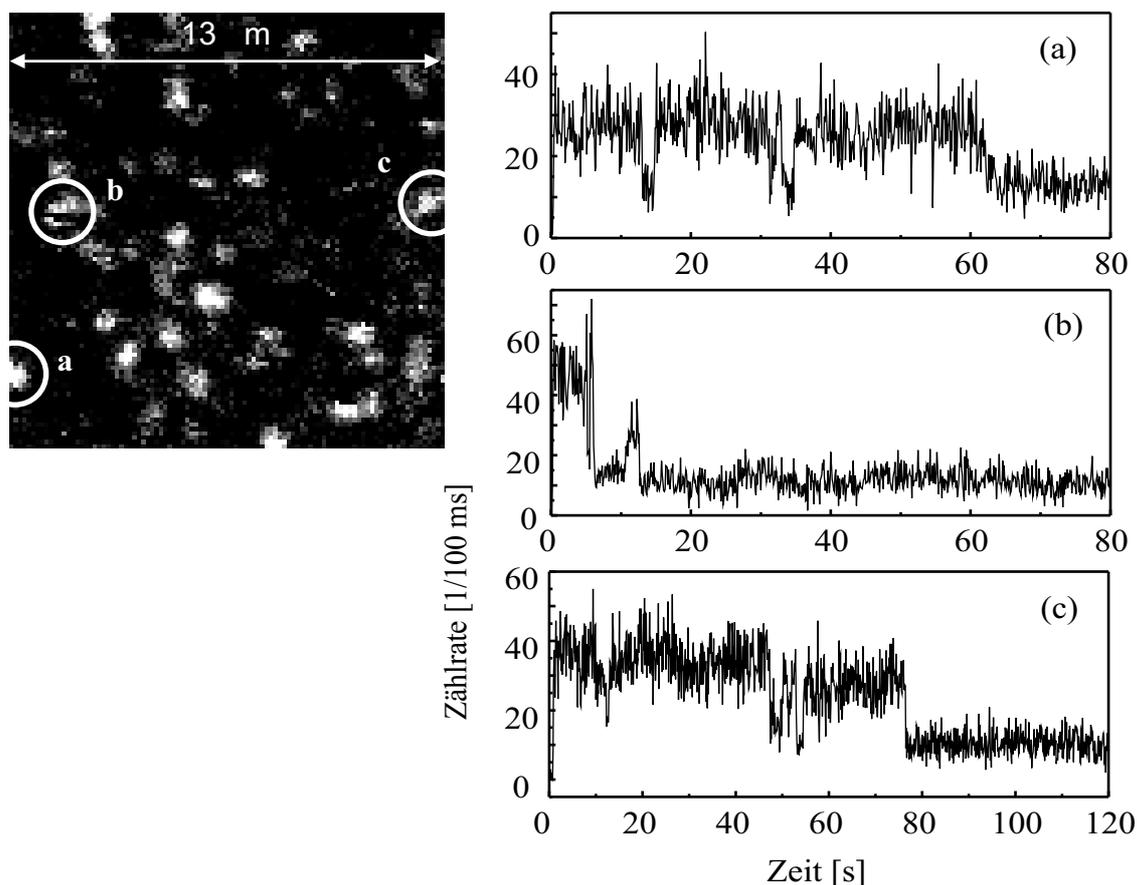


Abbildung 6.22: Fluoreszenzbild von einzelnen PEC-Trimern in Glyzerin/Puffer bei 60 K. An den drei markierten Stellen wurden die Zeitspuren (a), (b) und (c) detektiert, die digitales An- und Ausschalten von Fluoreszenz zeigen ($\lambda_{exc} = 585,0 \text{ nm}$, $I = 0,5 \text{ kW/cm}^2$). Das Blinken von Molekül (b) ist auch schon im Fluoreszenzbild zu beobachten.

Nach einigen Verdünnungsschritten gelang es ebenfalls ohne größere Probleme, einzelne Trimere von PEC zu isolieren (Abb. 6.22), die aufgrund der hohen Verdünnung möglicherweise auch in Monomere zerfallen waren. Trotz der neun bzw. drei eingebauten Chromophore ergaben sich Zählraten nur in der Größenordnung der Messungen an der α -Untereinheit, wobei die Qualität der Bilder und Zeitspuren durch die Erhöhung der Integrationszeit auf (meist) 100 ms bei Reduzierung der Anreizungsleistung verbessert wurde. Die Zeitspuren unterscheiden sich in ihren charakteristischen Merkmalen kaum von denen der α -Untereinheit. Es treten gelegentlich

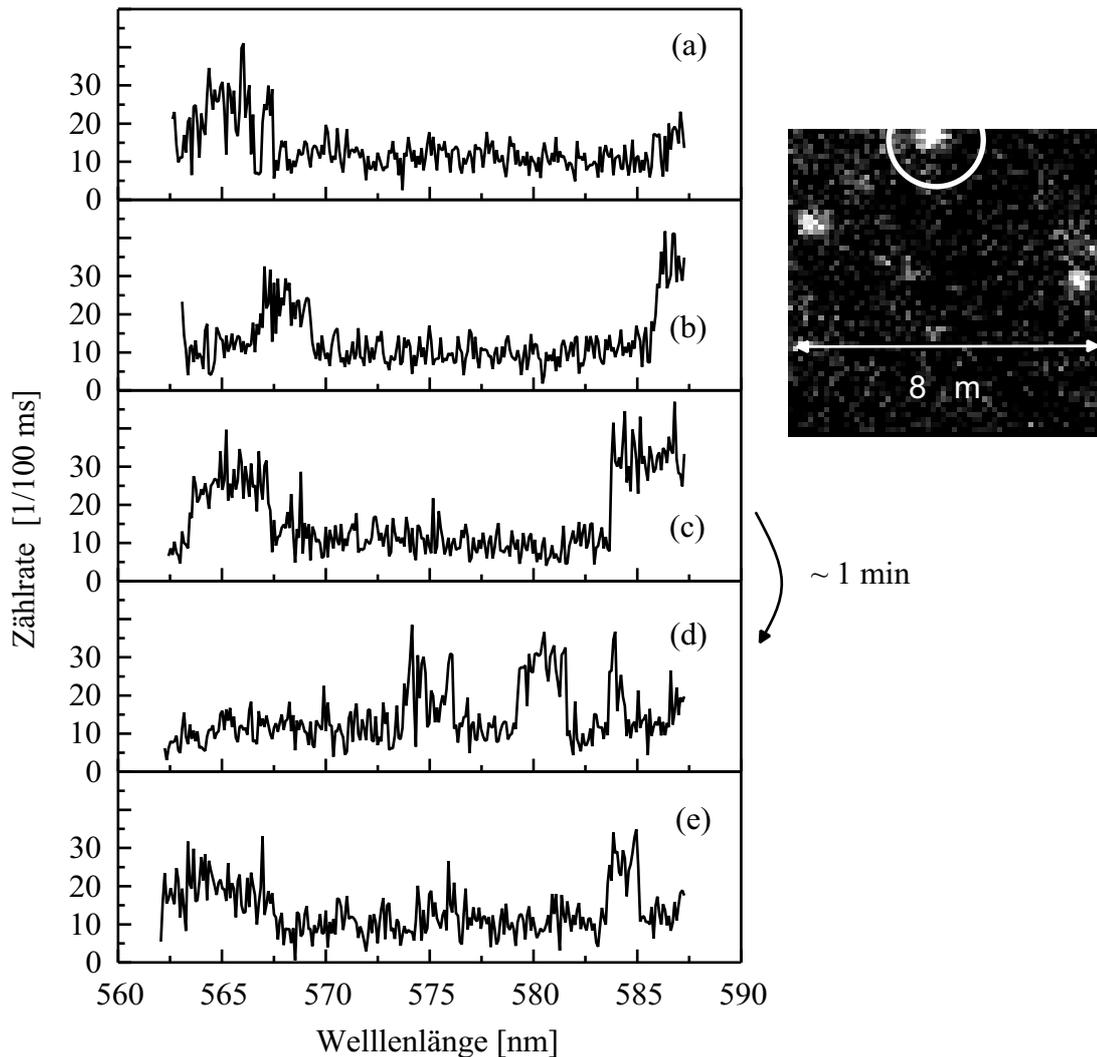


Abbildung 6.23: (a)-(e) Serie von Fluoreszenzanregungsspektren eines einzelnen PEC-Trimers in Glycerin/Puffer bei 4 K ($I = 0,5 \text{ kW/cm}^2$). Der Wellenlängenbereich ist durch den Laserfarbstoff ($\lambda > 562 \text{ nm}$) und die Filterkante ($\lambda < 588 \text{ nm}$) beschränkt. Im Fluoreszenzbild ($\lambda_{exc} = 585,0 \text{ nm}$) ist der zugehörige Spot markiert.

Intensitätsfluktuationen auf Niveaus zwischen dem Untergrund und dem Maximalwert auf, aber auch einstufige Bleichprozesse, die die starke Kopplung der neun bzw. drei Chromophore zu einem effektiven Quantensystem verdeutlichen. Die in Abb. 6.22 dargestellten Zeitspuren und das zugehörige Fluoreszenzbild wurden bei 60 K aufgenommen. Ähnliche Datensätze konnten auch bei 4 K gewonnen werden. Bei 4 K war jedoch die im Fluoreszenzbild erscheinende Konzentration der Moleküle etwa um den Faktor 5 geringer. Dieser Effekt ist zusätzlicher, spektraler Selektion zuzuordnen, und man kann daraus eine Linienverschmälerung durch Abkühlung auf

~ 20 % der Breite von Raumtemperatur ableiten.

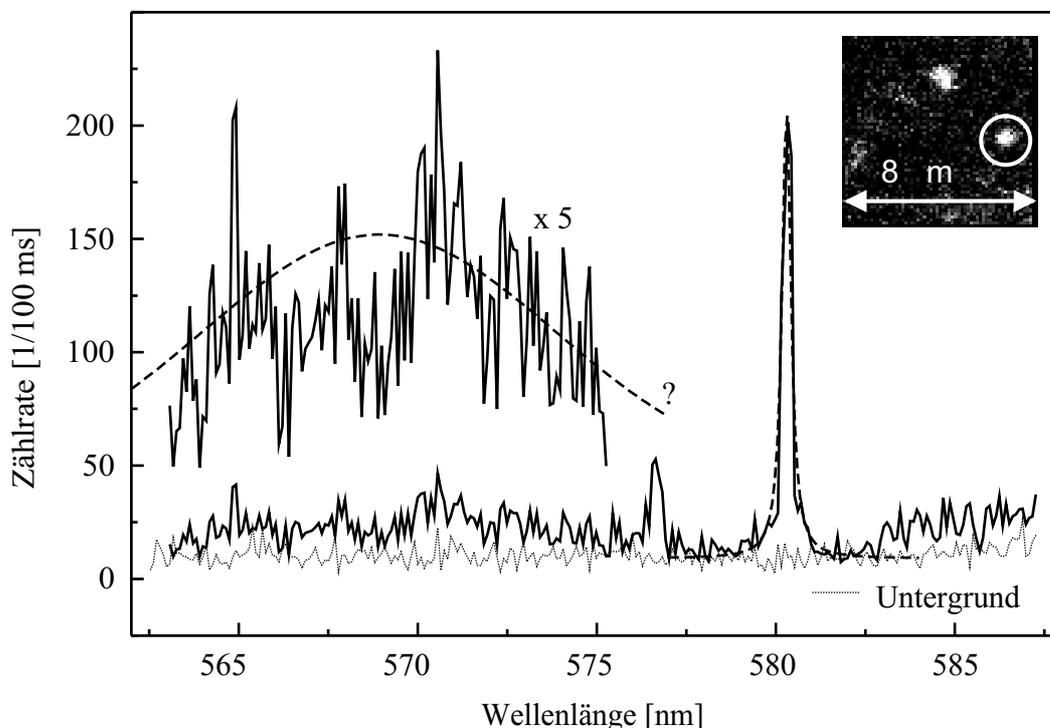


Abbildung 6.24: Fluoreszenzanregungsspektrum eines einzelnen PEC-Trimers in Glycerin/Puffer bei 4 K ($I = 0,5 \text{ kW/cm}^2$). Die intensive, schmale Bande bei 580 nm kann mit einer Lorentzfunktion (gestrichelt) der Halbwertsbreite 0,3 nm angepasst werden. Kurzwellig tritt neben einem kleinen Peak ähnlicher Breite bei 578 nm, möglicherweise einer zweiten Position der Nullphononenlinie, eine breite Bande auf (sie ist zusätzlich in fünffacher Intensität dargestellt). Eine optisch angepasste Gaußfunktion (gestrichelt, Zentrum bei 570 nm, Halbwertsbreite $\sim 11 \text{ nm}$), die in einigen Bereichen eingebrochener Fluoreszenz abweicht, könnte die Phononenseitenbande darstellen. Im Fluoreszenzbild ($\lambda_{exc} = 585,0 \text{ nm}$) ist der zugehörige Spot markiert. Zusätzlich ist ein Untergrundspektrum (gepunktet) dargestellt, das an einer dunklen Stelle im Fluoreszenzbild detektiert wurde.

Um weitere Informationen über die Linienbreite und -form zu gewinnen, wurden Fluoreszenzanregungsspektren aufgenommen. Die offenkettige Struktur der Tetrapyrrole lässt - im Gegensatz zu Chlorophyll - eine hohe Elektron-Phonon-Kopplungskonstante erwarten. Die Spektren werden deshalb wesentlich von den Phononenseitenbanden geprägt sein. Bei der Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren wurde der Laser breitbandig (ohne Etalons und ohne Brewster Plättchen) über 25 nm durch motorisiertes Verdrehen der doppelbrechenden Filters durchgestimmt. In den Spektren zeigt sich starke spektrale Dynamik (Abb. 6.23). Es treten Banden auf, die Breiten zwischen 1 und 5 nm haben, jedoch kein sauberes Profil einer Peakfunktion zeigen, sondern bei denen häufig abrupte Abbrüche der Fluoreszenz

wie beim Photobleichen auftreten. Die Absorptionsfrequenzen scheinen lichtinduziert ständig zu springen. Die Linienbreite kann nur zu ~ 5 nm abgeschätzt werden.

Bisher gelang es nur bei einem Molekül, eine schärfere Bande aufzunehmen. Da mehrere Punkte der Messdaten auf einer angepassten Lorentzkurve (rechte gestrichelte Linie in Abb. 6.24) liegen, ist dabei nicht von einem Artefakt auszugehen. Es könnte sich um die Nullphononenlinie handeln, die durch einen unbekanntem Mechanismus stabilisiert wurde. Sie hat eine Halbwertsbreite von $0,3$ nm ($\equiv 9$ cm^{-1} oder 300 GHz). Eine breite Bande, ähnlich der in den anderen Anregungsspektren, tritt kurzweilig auf. In Abb. 6.24 wurde spekulativ eine Gaußkurve eingezeichnet, die jedoch in einigen Bereichen mit eingebrochener Fluoreszenz abweicht. Man kann sie als zugehörige Phononenseitenbande mit einer Halbwertsbreite von ca. 11 nm betrachten.

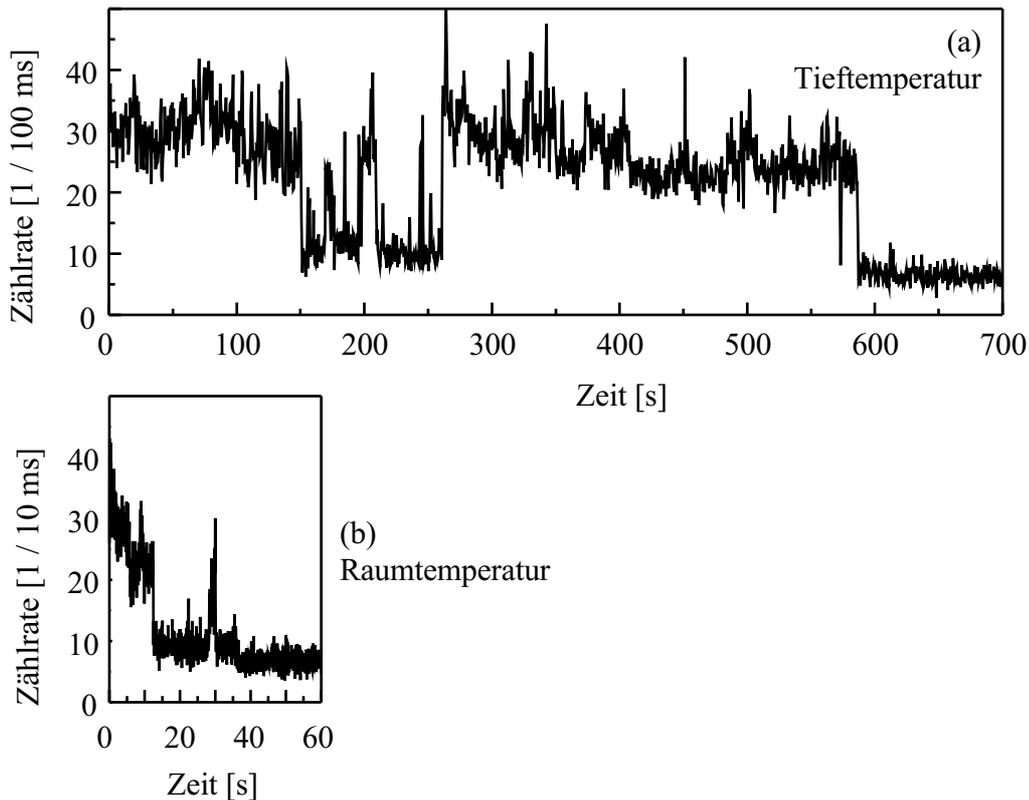


Abbildung 6.25: Fluoreszenzzeitspuren von PEC-Trimeren (bzw. Monomeren) bei (a) $3,6$ K und (b) Raumtemperatur ($\lambda_{exc} = 575,0$ nm, zirkular polarisiert, $I \approx 0,5$ kW/cm^2). Die Fluoreszenzzeit der Proteine ist bei tiefen Temperaturen mit bis zu etwa 10 min deutlich höher als bei Raumtemperatur mit einigen Sekunden. Allerdings gelingt bei Raumtemperatur in einem kommerziellen Mikroskop und Ölimmersionsobjektiv die Detektion von etwa der zehnfachen Zählrate (die Daten wurden freundlicherweise von P. Zehetmayer zur Verfügung gestellt).

Die bisherigen Ergebnisse sind ein vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen an dieser Proteinklasse. Es konnte gezeigt werden, dass Einzelmoleküldetektion möglich ist und spektrale Auflösung genutzt werden kann. Im Vergleich mit Raumtemperaturexperimenten zeigen die Proteine bei tiefen Temperaturen deutlich längere Lebenszeiten von bis zu zehn Minuten, bevor sie ausbleichen (Abb. 6.25). Die Abkühlung führt bei diesem Protein zu einer Stabilisierung des fluoreszierenden Zustands, so dass eine ausreichende Photonenzahl und damit genügend spektrale und dynamische Informationen gewonnen werden können.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die spektroskopische Untersuchung einzelner Moleküle in kondensierter Phase erstreckt sich erst über einen Zeitraum von zehn Jahren. In dieser verhältnismäßig kurzen Zeit vollzog sich eine rasante Entwicklung mit einer Vielzahl von Ergebnissen. Dies findet seinen Ausdruck in eigenen Tagungen und Zeitschriften und nicht zuletzt auch in einer Nobelkonferenz im Jahre 1999. Während sich anfangs die Untersuchungen auf eine Reihe faszinierender Tieftemperaturexperimente mit spektraler Selektion der einzelnen Moleküle beschränkten, verschob sich seit Mitte der 90er Jahre der Schwerpunkt der Forschung auf diesem Gebiet hin zu Experimenten mit räumlicher Selektion bei Raumtemperatur, die seit kurzer Zeit auch relativ uneingeschränkt bei Tieftemperatur möglich sind. Diese Entwicklung spiegelt sich auch in dieser Dissertation wider.

Zu Beginn dieser Arbeit stand eine spektral hochauflösende Apparatur zur Einzelmolekülspektroskopie bei kryogenen Temperaturen zur Verfügung. Mit dieser wurden Einzelmoleküluntersuchungen an dem neu synthetisierten Farbstoff Terrylendiimid (TDI) durchgeführt. TDI ist kein reiner Kohlenwasserstoff, wie die bis dahin üblicherweise verwendeten Chromophore, und lässt sich durch seine Seitengruppen an andere Systeme anbinden. Er zeigt neben exzellenten Fluoreszenzeigenschaften die zur spektralen Selektion nötigen schmalen Absorptionslinien. Wegen seiner Struktur lässt sich TDI nicht in einen Kristall einlagern. Mit Polyethylen und Hexadecan wurden jedoch zwei Matrizen gefunden, die es erlauben, Fluoreszenzanregungsspektren von einzelnen Molekülen zu detektieren.

In Hexadecan konnte bei Sättigungsuntersuchungen das theoretisch vorhergesagte Verhalten nachgewiesen werden. Dabei wurden Zählraten von fast 500 000 Counts pro Sekunde von einem einzelnen Molekül erreicht. Durch die Aufnahme und Auswertung der Fluoreszenzintensitäts-Autokorrelationsfunktion konnten die

Populations- und Depopulationsraten der Triplett-Subniveaus bestimmt werden. Dabei wurde auch spektrale Diffusion der Moleküle beobachtet, die mit Hilfe von *Two-Level Systems* (TLS) erklärt werden konnte. Mit einem komplexen theoretischen Modell und aufwendigen numerischen Berechnungen konnte die bei 2,5 K auftretende Verteilung von Linienbreiten der beobachteten Moleküle simuliert werden. Damit konnte den beiden Matrizen über die Analyse ihrer TLS-Dichte ein unterschiedlicher Grad an Unordnung zugeordnet werden. In temperaturabhängigen Untersuchungen der Linienform konnte der Unterschied im Ordnungsgrad der Matrizen bestimmt werden. Ferner konnten die Theorie von Hsu und Skinner in der Tieftemperaturnäherung bestätigt werden und ein tieferer Einblick in die auftretende Dynamik gewonnen werden. In der Auswertung der temperaturabhängigen Linienverschiebung wurde erstmals der Einfluss von Matrixexpansion berücksichtigt und als unverzichtbar für eine gute Beschreibung des Systems erkannt. Parallel zu den ersten Experimenten wurde eine aktive Stabilisierung des Farbstofflasers aufgebaut. Damit konnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Laserdrift ausgeschlossen werden.

Weitere Tieftemperaturuntersuchungen hatten die Beobachtung von Förster-Energietransfer (oder FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) an einem individuellen Donor-Akzeptor-Paar in seiner speziellen Konformation zum Ziel. Als Farbstoffmolekül stand ein Bichromophor aus Perylen und kovalent angebundenem TDI zur Verfügung. Obwohl beide Chromophore sich für Einzelmoleküluntersuchungen eignen und inzwischen schon mehrfach verwendet wurden, gelang es nicht, ein bezüglich Linienbreite und Frequenzposition identisches Fluoreszenzanregungsspektrum sowohl über Perylen-Fluoreszenz als auch über TDI-Fluoreszenz (nach Energietransfer) zu detektieren. Der Energietransferprozess scheint mit einem Linienverbreiterungsmechanismus verknüpft zu sein, so dass eine Beobachtung mit dem Aufbau in der Anfangsphase der Dissertation nicht möglich war. Eine Wiederaufnahme dieser Untersuchungen mit der neuen Apparatur ist zukünftigen Doktoranden vorbehalten.

Um allgemein temperaturabhängige Untersuchungen an fluoreszierenden Molekülen durchführen zu können, wurde ein Tieftemperaturmikroskop aufgebaut. Dafür wurde die Rastertechnik gewählt. Um die bekannten Probleme des Probescannens im Kryostaten, wie kleiner Scanbereich und fehlender Zugang im abgekühlten Zustand, zu vermeiden, wurde ein konfokales Laserscanning-Mikroskop entworfen und aufgebaut. Zur Strahlableitung wurden zwei Galvanometerspiegel gewählt und der Drehpunkt über ein telezentrisches System in das Objektiv abgebildet, das gemeinsam mit der Probe im Kryostaten sitzt. Die Detektion des Fluoreszenzlichts wird von einer hochempfindlichen Avalanche-Photodiode mit geringer Dunkelzählrate über-

nommen.

Die Funktion des Scanners und des gesamten optischen Aufbaus konnte an Testmustern und Testproben erfolgreich demonstriert werden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die erreichte Detektionseffizienz die Erwartungen nicht erfüllte. Das liegt im Wesentlichen am Objektiv, aber auch an den Abbildungsfehlern und Reflexionen der zahlreichen Elemente im Strahlengang. Die maximal erreichten Zählraten lagen bei 50 000 Counts pro Sekunde am System Terrylen in Polyethylen. Für Systeme mit einer ausreichend hohen Fluoreszenzrate ist es mit dieser Apparatur möglich, Fluoreszenzbilder, Zeitspuren, spektral hochauflösende Fluoreszenzanregungsspektren, Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzkorrelationsfunktionen von einzelnen Molekülen aufzunehmen, um damit spektrale und dynamische Eigenschaften der Moleküle zu bestimmen. Durch Variation der Temperatur können die Temperaturabhängigkeit der Messgrößen und Barrierenhöhen ermittelt werden.

Mit der neuen Apparatur wurden Untersuchungen in zwei neuen Themenbereichen begonnen, nämlich an einzelnen Sondenmolekülen in Nanoporen und an den fluoreszierenden Proteinen GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) und PEC (Phycoerythrocyanin). Erste Fluoreszenzanregungsspektren einzelner Terrylen-Moleküle in den Kanalstrukturen von mesoporösen Systemen der M41S-Klasse konnten beobachtet werden. Dabei ist die hohe spektrale Auflösung von großem Vorteil bei der Untersuchung der spektralen Dynamik der Sondenmoleküle. Im Bereich biologischer Proben konnten einzelne Moleküle des Grün Fluoreszierenden Proteins isoliert beobachtet werden. Die Anzahl an Fluoreszenzphotonen pro Molekül, die vor dem Übergang in einen Dunkelzustand an diesem System detektiert werden konnten, war allerdings sehr gering. Deshalb wurden Untersuchungen an einzelnen Proteinen aus dem Lichtsammelkomplex von Cyanobakterien begonnen, die in einer laufenden Doktorarbeit von P. Zehetmayer fortgeführt werden. Bei den Proteinproben handelt sich um Untereinheiten von Phycoerythrocyanin: die α -Untereinheit und das Trimer bzw. Monomer, in denen offenkettige Tetrapyrrol-Moleküle als Farbstoffe an die Proteinmatrix angebunden sind. Neben Fluoreszenzbildern und Zeitspuren konnten bereits Anregungsspektren detektiert werden, die starke spektrale Dynamik zeigen und weitere Untersuchungen herausfordern.

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden bereits in internationalen Zeitschriften und auf Tagungen veröffentlicht. Eine Übersicht befindet sich am Ende unter Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.

Literaturverzeichnis

- [1] W. Capelle, *Die Vorsokratiker* (Kröner, Stuttgart, 1968).
- [2] E. Schrödinger, *Brit. J. Philos.* (1952) 233.
- [3] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.* **49** (1982) 57.
- [4] G. Binnig, H. Rohrer, *Rev. Mod. Phys.* **59** (1987) 615.
- [5] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 930.
- [6] J. Frommer, *Angew. Chemie* **104** (1992) 1325.
- [7] J. K. Gimzewski, C. Joachim, *Science* **283** (1999) 1683.
- [8] H. G. Hansma, *J. Vac. Sci. Technol. B* **14** (1996) 1390.
- [9] W. M. Itano, J. C. Bergquist and D. J. Wineland, *Science* **237** (1987) 612.
- [10] H. Dehmelt, W. Paul, N. F. Ramsey, *Rev. Mod. Phys.* **62** (1990) 525.
- [11] T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **15** (1976) 2965.
- [12] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **62** (1989) 2535; *Anal. Chem.* **61** 1217A.
- [13] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **65** (1990) 2716.
- [14] W. P. Ambrose, W. E. Moerner, *Nature* **349** (1991) 225.
- [15] A. Zumbusch, L. Fleury, R. Brown, J. Bernard, M. Orrit, *Phys. Rev. Lett.* **70** (1993) 3584.
- [16] R. Kettner, J. Tittel, T. Basché, C. Bräuchle, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 6671.
- [17] W. P. Ambrose, T. Basché, W. E. Moerner, *J. Chem. Phys.* **95** (1991) 7150.

- [18] T. Basché, W. E. Moerner, *Nature* **355** (1992) 335.
- [19] U. P. Wild, F. Güttler, M. Pirotta, A. Renn, *Chem. Phys. Lett.* **193** (1992) 451.
- [20] M. Orrit, J. Bernard, A. Zumbusch, R. I. Personov, *Chem. Phys. Lett.* **196** (1992) 595.
- [21] M. Croci, H. J. Müschenborn, F. Güttler, A. Renn, U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **212** (1993) 71.
- [22] T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit, H. Talon, *Phys. Rev. Lett.* **69** (1992) 1516.
- [23] J. Bernard, L. Fleury, H. Talon, M. Orrit, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 850.
- [24] J. Köhler, J. A. J. M. Disselhorst, M. C. J. M. Donckers, E. J. J. Groenen, J. Schmidt, W. E. Moerner, *Nature* **363** (1993) 242.
- [25] J. Wachtrup, C. v. Borczyskowski, J. Bernard, M. Orrit, R. Brown, *Nature* **363** (1993) 244.
- [26] J. Wachtrup, C. v. Borczyskowski, J. Bernard, M. Orrit, R. Brown, *Phys. Rev. Lett.* **71** (1993) 3565.
- [27] J. Köhler, A. C. J. Brouwer, E. J. J. Groenen, J. Schmidt, *Science* **268** (1995) 1457.
- [28] T. Basché, S. Kummer, C. Bräuchle, *Nature* **373** (1995) 132.
- [29] P. Tamarat, B. Lounis, J. Bernard, M. Orrit, S. Kummer, R. Kettner, S. Mais, T. Basché, *Phys. Rev. Lett.* **75** (1995) 1514.
- [30] C. Brunel, B. Lounis, P. Tamarat, M. Orrit, *Phys. Rev. Lett.* **81** (1998) 2679.
- [31] T. Plakhotnik, D. Walser, M. Pirotta, A. Renn, U. P. Wild, *Science* **271** (1996) 1703.
- [32] F. Kulzer, S. Kummer, R. Matzke, C. Bräuchle, T. Basché, *Nature* **387** (1997) 688.
- [33] A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. J. Aartsma, J. Schmidt, *Science* **285** (1999) 400.
- [34] T. Plakhotnik, E. A. Donley, U. P. Wild, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48** (1997) 181.

- [35] L. Kador, *Phys. Stat. Sol. (b)* **189** (1995) 11.
- [36] J. L. Skinner, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 13251.
- [37] M. Orrit, J. Bernard, R. Brown, B. Lounis in E. Wolf (Hrsg.) *Progress in Optics XXXV* (Elsevier, 1996) 61.
- [38] T. Basché, C. Bräuchle, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996) 1269.
- [39] W. E. Moerner, *Science* **265** (1994) 46.
- [40] W. E. Moerner, T. Basché, *Angew. Chem.* **105** (1993) 537; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32** (1993) 457.
- [41] Serie *Single Molecules* in *Science* **283** (1999) 1667 ff.
- [42] T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit, U. P. Wild (Hrsg.) *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy* (Verlag Chemie, Weinheim, 1997).
- [43] Serie *Single Molecules and Atoms* in *Acc. Chem. Res.* **29** (1996) 561 ff.
- [44] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **174** (1990) 553.
- [45] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. van Orden, J. H. Werner, R. A. Keller, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2929.
- [46] J. R. Fries, L. Brand, C. Eggeling, M. Köllner, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 6601.
- [47] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, M. E. Johnson, J. C. Martin, B. L. Marrone, J. A. Schecker, C. W. Wilkerson, R. A. Keller, A. Haces, P.-J. Shih, J. D. Harding, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **97** (1993) 1535.
- [48] E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **262** (1993) 1422.
- [49] J. K. Trautman, J. J. Macklin, L. E. Brus, E. Betzig, *Nature* **369** (1994) 40.
- [50] X. S. Xie, R. C. Dunn, *Science* **265** (1994) 361.
- [51] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **72** (1994) 160.
- [52] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Science* **265** (1994) 364.

- [53] R. X. Bian, R. C. Dunn, X. S. Xie, P. T. Leung, *Phys. Rev. Lett.* **75** (1995) 4772.
- [54] J. K. Trautman, J. J. Macklin, *Chem. Phys.* **205** (1996) 221.
- [55] J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, *Science* **272** (1996) 255.
- [56] F. Güttler, T. Irngartinger, T. Plakhotnik, A. Renn, U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **217** (1994) 393.
- [57] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature* **374** (1995) 555.
- [58] R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, T. Yaganida, *Nature* **380** (1996) 451.
- [59] Th. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 2926.
- [60] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **388** (1997) 355.
- [61] H. P. Lu, L. Xun, X. S. Xie, *Science* **282** (1998) 1877.
- [62] H. P. Lu, X. S. Xie, *Nature* **385** (1997) 143.
- [63] R. M. Dickson, D. J. Norris, Y.-L. Tzeng, W. E. Moerner, *Science* **274** (1996) 966.
- [64] T. Ha, Th. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 6264.
- [65] D. A. Vanden Bout, W.-T. Yip, D. Hu, D.-K. Fu, T. M. Swager, P. F. Barbara, *Science* **277** (1997) 1074.
- [66] H. P. Lu and X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 2753.
- [67] T. Ha, Th. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3979.
- [68] T. Ha, J. Glass, Th. Enderle, D. S. Chemla, S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **80** (1998) 2093.
- [69] X. S. Xie, J. K. Trautman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49** (1998) 441.

- [70] M. Wu, P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, R. A. Keller, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 17406.
- [71] M. A. Bopp, Y. Jia, L. Li, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 10630.
- [72] S. Mais, J. Tittel, T. Basché, C. Bräuchle, W. Göhde, H. Fuchs, G. Müller, K. Müllen, *J. Phys. Chem. A* **101** (1997) 8435.
- [73] R. Kubo, in D. ter Harr (Hrsg.), *Fluctuation, Relaxation and Resonance in Magnetic Systems* (Olivier and Boyd, Edinburgh, 1965).
- [74] J. Friedrich, D. Haarer, *Angew. Chemie* **96** (1984) 96.
- [75] H.-W. Augustin, *Dissertation* (Universität München, 1998).
- [76] D. Hsu, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 1604.
- [77] J. L. Skinner, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **39** (1988) 463.
- [78] W. E. Moerner (Hrsg.), *Persistent Spectral Hole-Burning: Science and Applications* (Springer, Berlin, 1989).
- [79] A. Szabo, *Phys. Rev. Lett.* **25** (1970) 924.
- [80] I. I. Abram, R. A. Auerbach, R. R. Birge, B. E. Kohler, J. M. Stevenson, *J. Chem. Phys.* **63** (1975) 2473.
- [81] L. Kador, D. E. Horne, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **94** (1990) 1237.
- [82] L. Kador, T. Latychevskaia, A. Renn, U. P. Wild, *J. Chem. Phys.* **111** (1999) 8755.
- [83] W. E. Moerner, T. P. Carter, *Phys. Rev. Lett.* **59** (1987) 2705.
- [84] J. Engelhardt, W. Knebel, *Physik i. u. Zeit* **24** (1993) 70.
- [85] T. Hellmuth, *Phys. Bl.* **49** (1993) 489.
- [86] J. W. Lichtman, *Spek. d. Wiss.* (Okt. 1994) 78.
- [87] J. B. Pawley (Hrsg.), *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Plenum Press, New York, 1995) .
- [88] T. R. Corle, G. S. Kino, *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Inaging Systems* (Academic Press, San Diego, 1996).

- [89] J. Z. Young, F. Roberts, *Nature* **167** (1951) 231.
- [90] M. Minski, *U. S. Patent 3,013,467* (19. Dezember 1961) .
- [91] M. Minski, *Scanning* **10** (1988) 128.
- [92] S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare, *Science* **266** (1994) 1018.
- [93] M. Eigen, R. Riegler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 5740.
- [94] S. Maiti, U. Haupts, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 11753.
- [95] E. Hecht, *Optik* (Addison-Wesley, Bonn, 1989).
- [96] D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer, *Photochemie* (Wiley-VCh, Weinheim, 1998).
- [97] W. E. Moerner, *J. Lumin.* **60&61** (1994) 997.
- [98] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics* (Wiley, New York, 1982).
- [99] H. de Vries, D. A. Wiersma, *J. Chem. Phys.* **70** (1979) 5807.
- [100] R. Loudon, *The Quantum Theory of Light* (Oxford University Press, New York, 1991) .
- [101] C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc, G. Grynberg, *Atom-Photon Interactions* (Wiley, New York, 1992).
- [102] R. Hanbury Brown, R. Q. Twiss, *Nature* **177** (1956) 27.
- [103] R. Hanbury Brown, R. Q. Twiss, *Nature* **178** (1956) 1046.
- [104] H. J. Kimble, M. Dagenais, L. Mandel, *Phys. Rev. Lett.* **39** (1977) 691.
- [105] F. Diedrich, H. Walther, *Phys. Rev. Lett.* **58** (1987) 203.
- [106] S. Kummer, S. Mais, T. Basché, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 17078.
- [107] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. Enderlein, D. J. Semin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Chem. Phys. Lett.* **269** (1997) 365.
- [108] M. Wu, P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, R. A. Keller, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 17406.
- [109] P. W. Anderson, B. I. Halperin, C. M. Varma, *Phil. Mag.* **25** (1972) 1.

- [110] W. A. Phillips, *J. Low. Temp. Phys.* **7** (1972) 351.
- [111] R. Kettner, *Dissertation* (Universität München, 1996).
- [112] R. Silbey, K. Kassner, *J. Lumin.* **36** (1987) 283.
- [113] E. Geva, J. L. Skinner, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 8920.
- [114] P. D. Reilly, J. L. Skinner, *Phys. Rev. Lett.* **71** (1993) 4257.
- [115] L. Fleury, *Dissertation* (Université Bordeaux, 1995).
- [116] A. M. Stoneham, *Rev. Mod. Phys.* **41** (1969) 82.
- [117] B. Jackson, R. Silbey, *Chem. Phys. Lett.* **99** (1983) 331.
- [118] E. Geva, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **109** (1998) 4920.
- [119] D. Hsu, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **83** (1985) 2097.
- [120] J. L. Skinner, D. Hsu, *J. Phys. Chem.* **90** (1986) 4931.
- [121] C. B. Harris, *J. Chem. Phys.* **67** (1977) 5607.
- [122] S. Marks, P. A. Cornelius, C. B. Harris, *J. Chem. Phys.* **73** (1980) 3069.
- [123] G. J. Small, *Chem. Phys. Lett.* **57** (1978) 501.
- [124] K. E. Jones, A. H. Zewail, in A. H. Zewail (Hrsg.), *Advances in Laser Chemistry* (Springer, New York, 1978) .
- [125] P. de Bree, D. A. Wiersma, *J. Chem. Phys.* **70** (1979) 790.
- [126] T. Sesselmann, W. Richter, D. Haarer, H. Morawitz, *Phys. Rev. B* **36** (1987) 7601.
- [127] A. Müller, W. Richter, L. Kador, *Chem. Phys. Lett.* **241** (1995) 547.
- [128] J. Tittel, *Dissertation* (Universität München, 1997).
- [129] S. Kummer, *Dissertation* (Universität München, 1996).
- [130] H. Kogelnik, T. Li, *Proc. IEEE* **54** (1966) 1312.
- [131] A. E. Siegman, *Lasers* (University Science Books, 1986).
- [132] F. K. Kneubühl, M. W. Sigrist, *Laser* (Teubner Verlag, 1991).

- [133] T. Basché, *Dissertation* (Universität München, 1991).
- [134] W. Demtröder, *Laserspektroskopie* (Springer, Berlin, 1991).
- [135] Entworfen und gebaut von H. Herz, Elektroniklabor (1997).
- [136] A. Yariv, *Quantum Electronics* (Wiley, New York, 1985).
- [137] W. Lauterborn, T. Kurz, M. Wiesenfeldt, *Kohärente Optik* (Springer, Berlin, 1993).
- [138] A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. J. Aartsma, J. Schmidt, *Chem. Phys.* **247** (1999) 53.
- [139] H. Kuchling, *Taschenbuch der Physik* (Verlag Harri Deutsch, Frankfurt/Main, 1989) .
- [140] P. Zehetmayer, *Diplomarbeit* (Universität München, 1999).
- [141] F. Holtrup, G. Müller, H. Quante, S. De Freyer, F. C. De Schryver, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **3** (1997) 219.
- [142] P. Schlichting, B. Duchscherer, G. Seisenberger, T. Basché, C. Bräuchle, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **5** (1999) 2388.
- [143] S. Mais, G. Müller, K. Müllen, C. Bräuchle, *J. Inf. Recording* **24** (1998) 481.
- [144] S. Mais, G. Müller, K. Müllen, C. Bräuchle, *Chem. Phys.* **247** (1999) 41.
- [145] E. V. Shpol'skii, A. A. Il'ina, L. A. Klimova, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **87** (1952) 935.
- [146] A. B. Myers, P. Tchénio, M. Z. Zgierski, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 10377.
- [147] P. Tchenio, A. B. Myers, W. E. Moerner, *Chem. Phys. Lett.* **213** (1993) 325.
- [148] S. Kummer, T. Basché, C. Bräuchle, *Chem. Phys. Lett.* **229** (1994) 309; *ibid.* **232** (1995) 414.
- [149] G. Seisenberger, Messung am Fluoreszenzspektrometer F900 von *Edinburgh Instruments* (1999).
- [150] A.-M. Boiron, B. Lounis, M. Orrit, *J. Phys. Chem* **105** (1996) 3969.
- [151] L. Fleury, A. Zumbusch, M. Orrit, R. Brown, J. Bernard, *J. Lumin.* **56** (1993) 15.

- [152] B. Kozankiewicz, J. Bernard, M. Orrit, *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 9377.
- [153] M. Vacha, Y. Liu, H. Nakatsuka, T. Tani, *J. Chem. Phys.* **106** (1997) 8324.
- [154] T. Irngartinger, H. Bach, A. Renn, U. P. Wild, in R. W. Munn et al. (Hrsg.) *Electrical and Related Properties of Organic Solids* (Kluwer Academic Publishers, 1997) 359.
- [155] S. J. Zilker, J. Friebe, D. Haarer, Y. G. Vainer, R. I. Personov, *Chem. Phys. Lett.* **289** (1998) 553.
- [156] S. J. Zilker, L. Kador, J. Friebe, Y. G. Vainer, M. A. Kol'chenko, R. I. Personov, *J. Chem. Phys.* **109** (1998) 6780.
- [157] L. Fleury, A. Gruber, A. Dräbenstedt, J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski, *J. Chem. Phys. B* **101** (1997) 7933.
- [158] G. K. White, C. L. Choy, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **22** (1984) 835.
- [159] A. Müller, W. Richter, L. Kador, *Chem. Phys. Lett.* **241** (1995) 547.
- [160] S. Mais, *Diplomarbeit* (Universität München, 1995).
- [161] J. L. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Plenum Press, New York, 1983).
- [162] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules* (Wiley, New York, 1970).
- [163] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **27** (1959) 7.
- [164] I. B. Berlman, *Energie Transfer Parameters of Aromatic Compounds* (Academic Press, New York, 1973).
- [165] F. Schwabl, *Quantenmechanik* (Springer-Verlag, Berlin, 1992).
- [166] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **21** (1953) 836.
- [167] S. Levy, M. B. Rubin, S. Speiser, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **66** (1992) 159 ; S. Levy, M. B. Rubin, S. Speiser, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 10747.
- [168] G. D. Scholes, A. H. A. Clayton, K. P. Ghiggino, *J. Chem. Phys.* **97** (1992) 7405.
- [169] T. Förster, in O. Sinanoglu (Hrsg.), *Modern Quantum Chemistry* (Academic Press, New York, 1968) S. 93.

- [170] T. Förster, *Z. Naturforsch.* **49** (1949) 321.
- [171] T. Förster, *Ann. Phys.* **2** (1948) 55.
- [172] R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.* **24** (1956) 966.
- [173] G. J. Kavarnos, N. J. Turro, *Chem. Rev.* **86** (1986) 401.
- [174] Persönliche Mitteilung von H. Platz, MPI für Polymerforschung, nach zykl voltametrischen Messungen.
- [175] F. Schüth, *Chem. i. u. Zeit* **29** (1995) 42.
- [176] R. P. Feynman, *Sci. Eng.* **23** (1960) 22.
- [177] S. D. Cox, T. E. Gier, G. D. Stucky, J. Bierlein, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1990) 609.
- [178] U. Vietze, O. Krauß, F. Laeri, G. Ihlein, F. Schüth, B. Limburg, M. Abraham, *Phys. Rev. Lett.* **81** (1998) 4628.
- [179] M. Ehrl, H. W. Kindervater, F. W. Deeg, C. Bräuchle, R. Hoppe, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 11756.
- [180] C.-G. Wu, T. Bein, *Science* **264** (1994) 1757.
- [181] J. Y. Ying, C. P. Mehnert, M. S. Wong, *Angew. Chem.* **38** (1999) 58.
- [182] J. Hulliger, O. König, R. Hoss, *Adv. Mater.* **8** (1995) 719.
- [183] R. Hoss, O. König, V. Kramer-Hoss, U. Berger, P. Rogin, J. Hulliger, *Angew. Chem.* **108** (1996) 1774.
- [184] L. Fleury, Ph. Tamarat, B. Lounis, J. Bernard, M. Orrit, *Chem. Phys. Lett.* **236** (1995) 87.
- [185] M. Sauer, C. Zander, R. Müller, B. Ullrich, K. H. Drexhage, S. Kaul, J. Wolfrum, *Appl. Phys. B* **65** (1997) 427.
- [186] G. Seisenberger, in Vorbereitung (1999).
- [187] A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. J. Aartsma, J. Schmidt, *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 9363.
- [188] R. Y. Tsien, *Ann. Rev. Biochem.* **67** (1998) 509.

- [189] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, J. Cormier, *Gene* **111** (1992) 229.
- [190] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **263** (1994) 802.
- [191] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **273** (1996) 1392.
- [192] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips Jr., *Nature Biotech.* **14** (1996) 1246.
- [193] K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormö, S. J. Remington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 2306.
- [194] M. Chatteraj, B. A. King, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 8362.
- [195] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke, F. Pollinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C. M. Sylvania, M. M. Yang, D. C. Youvan, M. E. Michel-Beyerle, *Chem. Phys.* **213** (1996) 1.
- [196] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nature Biotech.* **17** (1999) 969.
- [197] G. Jung, S. Mais, A. Zumbusch, C. Bräuchle, *J. Phys. Chem. A* **104** (2000) 873.
- [198] D. W. Pierce, N. Horn-Booher, R. D. Vale, *Nature* **388** (1997) 338.
- [199] G. Jung, J. Wiehler, W. Göhde, J. Tittel, T. Basché, B. Steipe, C. Bräuchle, *Bioimaging* **6** (1998) 54.
- [200] M. F. Garcia-Parajo, J.-A. Veerman, G. M. J. Segers-Nolten, B. G. de Grooth, J. Greve, N. F. van Hulst, *Cytometry* **36** (1999) 239.
- [201] C. Seebacher, F. W. Deeg, C. Bräuchle, J. Wiehler, B. Steipe, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 7728.
- [202] T. M. H. Creemers, A. J. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin, S. Völker, *Nature Struct. Biol.* **4** (1999) 557.
- [203] E. Boschetti, *J. Chromatogr. A* **658** (1994) 207.
- [204] C. Seebacher, persönliche Mitteilung (1999).

- [205] D. A. Bryant, *Advances in Photosynthesis: The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Kluwer Academic, Dordrecht, 1994).
- [206] L. Ying, X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 10399.
- [207] A. Parbel, *Dissertation* (Universität München, 1997).
- [208] K.-H. Zhao, H. Scheer, *Biochim. Biophys. Acta* **1228** (1995) 253.
- [209] M. Dürring, R. Huber, W. Bode, R. Rübli, H. Zuber, *J. Mol. Biol.* **211** (1990) 633.

Veröffentlichungen

1. Ph. Tamarat, B. Lounis, J. Bernard, M. Orrit, S. Kummer, R. Kettner, S. Mais, Th. Basché,
Pump-probe experiments with a single molecule: ac-Stark effect and nonlinear optical response,
Phys. Rev. Lett. **75** (1995) 1514-1517.
2. S. Kummer, S. Mais, Th. Basché,
Measurement of optical dephasing of a single terrylene molecule with nanosecond time resolution,
J. Phys. Chem. **99** (1995) 17078-17081.
3. S. Mais, J. Tittel, Th. Basché, C. Bräuchle, W. Göhde, H. Fuchs, G. Müller, K. Müllen,
Terrylenediimide: A novel fluorophore for single-molecule spectroscopy and microscopy from 1.4 K to room temperature,
J. Phys. Chem. A **101** (1997) 8435-8440.
4. S. Mais, G. Müller, K. Müllen, C. Bräuchle,
Terrylenediimide: A promising chromophore for single-molecule spectroscopy at low temperatures,
J. Inf. Recording **24** (1998) 481-489.
5. S. Mais, Th. Basché, G. Müller, K. Müllen, C. Bräuchle,
Probing the spectral dynamics of single terrylenediimide molecules in low-temperature solids,
Chem. Phys. **247** (1999) 41-52.
6. G. Jung, S. Mais, A. Zumbusch, C. Bräuchle,
The role of dark states in the photodynamics of green fluorescent protein examined with two-color fluorescence excitation spectroscopy,
J. Phys. Chem. A **104** (2000) 873-877.

Tagungsbeiträge

1. Single Molecule Spectroscopy: New Systems and Methods, März 1996, Ascona
Poster: Quantum Optics and Spectral Dynamics of Single Molecules,
S. Kummer, R. Kettner, S. Mais, Th. Basché, C. Bräuchle.
2. CLEO / EQEC, September 1996, Hamburg
Vortrag: Quantum Effects and Spectral Dynamics of Single Terrylene Molecules in a p-Terphenyl Crystal,
S. Mais, S. Kummer, F. Kulzer, Th. Basché.
3. DPG-Tagung, März 1997, Münster
Vortrag: Einzelmolekülspektroskopie mit substituiertem Terrylen,
S. Mais, G. Müller, K. Müllen, Th. Basché, C. Bräuchle.
4. GDCh-Tagung, November 1997, Köln
Poster: Terrylendiimid: Ein vielversprechender Chromophor für die Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen,
S. Mais, J. Tittel, G. Müller, K. Müllen, Th. Basché, C. Bräuchle.
5. DPG-Tagung, März 1998, Bayreuth
Poster: Die optische Linienform einzelner Moleküle in kondensierter Materie,
S. Mais, K. Müllen, Th. Basché, C. Bräuchle.
6. DPG-Tagung, März 1999, Münster
Poster: Konfokale Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Moleküle zwischen 1,4 K und Raumtemperatur,
S. Mais, P. Zehetmayer, C. Bräuchle.
7. Nano-Forum, Mai 1999, Linz
Vortrag: Einzelmolekülspektroskopie: Methoden und Ziele für die Nanotechnologie,
S. Mais, C. Bräuchle.
8. Tagung der VW-Stiftung: New Trends in Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules, Juni 1999, Wiesbaden
Poster: Spectral Dynamics of Single Terrylendiimide Molecules in Solid Matrices at Low Temperatures,
S. Mais, C. Bräuchle.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Christoph Bräuchle für die interessante Themenstellung und sein begeisterndes Interesse an dieser Arbeit
- Dr. Andreas Zumbusch für seinen Einsatz bei allen Problemen und das Korrekturlesen dieser Arbeit
- Prof. Dr. Thomas Basché für seine Unterstützung in den ersten Monaten dieser Arbeit
- Dr. Moritz Ehrl und Dr. Fred-Walter Deeg für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und ihre kompetenten Beiträge
- den Ehemaligen, insbesondere Dr. Rolf Kettner, Dr. Su Kummer, Dr. Jakob Tittel, Dr. Karen Diercksen, Florian Kulzer und Felix Koberling, für die vielen lehrreichen und amüsanten Stunden in Labor, Büro oder sonstwo
- der SMS-Gruppe, insbesondere Gregor Jung und Peter Zehetmayer, für die produktive Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre
- allen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere den Kurzzeitlern, den NLOlern, den Leuchtdioden und den Photorefraktiven, für alle ihre Dienstleistungen und die gute Stimmung
- allen Kooperationspartnern für die freundliche Überlassung von Proben: der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Müllen, Andreas Glaue und Prof. Dr. P. Behrens, Peter Rechsteiner und Prof. J. Hulliger, Jens Wiehler und Dr. Boris Steipe, sowie Dr. Axel Parbel und Prof. Dr. H. Scheer
- der Feinmechanischen Werkstatt für die gelungene Anfertigung des Probenstabs und der vielen anderen Teile, allen Mitarbeitern des Elektroniklabors für ihre wertvollen Beiträge, sowie allen weiteren Angestellten am Institut, besonders Frau Steger und Frau Vock für die freundliche Hilfe in allen verwaltungstechnischen Angelegenheiten
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung
- meinen Eltern, ohne die ich nie bis zu dieser Arbeit gekommen wäre
- meiner Freundin Karin, für ihre vielen Stunden des Verzichts und ihre aufmunternde Unterstützung

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Mais
Geburtsdatum: 10.07.1970
Geburtsort: München
Anschrift: Josef-Retzer-Str. 45, 81241 München
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976 - 1989 Grundschole und Gymnasium in München
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

6/1989 - 8/1990 Wehrdienst als Sanitätsausbilder

Studium

10/1990 - 3/1991 Bauingenieurwesen (TU München)
4/1991 - 3/1996 Physik (LMU München)
Abschluß: Diplom

seit 5/1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter am LS Prof. Bräuchle,
Institut für Physikalische Chemie der LMU München,
Bearbeitung des vorliegenden Themas