

# **Phänomenologische Auswertung einzelmolekülspektroskopischer Erscheinungen**

*Beschreibung, Klassifikation und statistische Analyse  
der zeitabhängigen Fluoreszenz einzelner Moleküle*

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt von  
Dipl. Chem. Frank Stracke  
aus Schmallenberg

Eingereicht beim Fachbereich Chemie/Biologie  
der Universität Siegen  
Siegen 2002

urn:nbz:de:hbz:467-346

---

Datum der Prüfung : 22. Februar 2003

Gutachter: Prof: Dr. A. J. Meixner  
Prof. Dr. H. J. Butt  
Prof. Dr. H. J. Deiseroth

## **Abstract**

Einzelne fluoreszierende Moleküle aus der Farbstoffklasse der Perylendicarboximide, eingebettet in Polystyrol, wurden abgebildet und spektroskopisch untersucht. Dabei wurde das Fluoreszenzspektrum der Farbstoffmoleküle zeitlich mit einer Auflösung von 1s verfolgt. Insgesamt zeigt sich bei allen untersuchten Farbstoffen eine breite Diversität spektraler Parameter und reichhaltige Dynamik unterschiedlichster Ausprägung. Zur Auswertung dieser Phänomene wurden diese beschrieben und klassifiziert, sowie ohne Ausgangshypothesen statistisch ausgewertet.

Die verschiedenen Parameter der einzelnen Spektren wurden durch eine eigens entwickelte Software ausgemessen und protokolliert. Die statistische Auswertung der protokollierten Parameter bot den Zugang zu reproduzierbaren und spezifischen Eigenschaften der untersuchten Farbstoff/Matrix Systeme auch für solche Größen, die im Ensembleexperiment nicht zugänglich sind (Größen, die dynamisches Verhalten beschreiben; Größen, die aus der Verknüpfung mehrerer Einzelmolekülparameter abgeleitet sind).

Die Analyse von Verteilungsfunktionen der gemessenen Größen und die Untersuchung von Korrelationen zwischen diesen Größen ließ umfangreiche Aussagen über das molekulare Verhalten sowohl der Farbstoffe als auch des umgebenden Polymers zu. Es wurden die verschiedenen Typen spektraler Dynamik auf ihren Zusammenhang untersucht, sowie die Ursache der einzelnen Phänomene weitestgehend eingegrenzt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die eingeführten Konzepte, Methoden und Darstellungsweisen möglichst allgemein anwendbar waren.

Single fluorescent dye molecules from the perylenedicarboximide class embedded in Polystyrene were imaged and studied spectroscopically by means of tracing their fluorescence spectrum with a temporal resolution of 1s. All of the investigated dyes exhibited a wide diversity of spectral properties and a multiplicity of dynamic phenomena. In order to analyse these phenomena a detailed description and classification was performed, succeeded by statistical analysis.

The various parameters of single spectra were gauged and recorded by a specially developed software. The statistical analysis of the recorded parameters gave access to representative and specific properties of the investigated Dye/Host-System, even for quantities which are not accessible in ensemble experiments.

The investigation in distributions of those quantities and studies on their correlation allowed extensive statements on molecular behaviour of both the dye and the polymer. The different forms of appearance in spectral dynamics were examined for coherence. Further the origin of the dynamic phenomena were widely contained. It was taken care, that all introduced concepts, methods and charts are at possible commonly applicable.

## **Dank**

Diese Arbeit entstand zwischen Juli 1998 und Oktober 2002 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. J. Meixner, dem ich für die Überlassung des Themas, Diskussionsbereitschaft und die gewährten Freiräume danke.

Des weiteren gilt mein Dank meinen Kollegen in der PCI, sowie denen der gesamten Physikalischen Chemie, für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besondere Erwähnung finden sollen an dieser Stelle Christian Blum, der die zur Auswertung verwendeten Anwendungen programmierte, Volker Franz, der die AFM-Aufnahmen der Probenoberfläche durchführte, sowie Vera Schellenschläger für die Anfertigung von IR- und Ramanspektren.

Für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Fluoreszenzfarbstoffe bedanke ich mich bei Stefan Becker und Prof. Dr. K. Müllen vom Max Planck Institut für Polymerforschung, Mainz.

Ich danke den technischen Mitarbeitern des Fachbereichs in der mechanischen Werkstatt, der Elektrotechnik, dem Chemikalienlager und der Glasbläserei für ihr Engagement.

Schließlich geht mein Dank an meine Eltern, Freunde und an Sandra, die süße Maus, für Unterstützung und Ablenkung.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Eine kleiner historischer Exkurs</i>	1
1.2	<i>Ziele &amp; Konzepte</i>	4
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil</b>	<b>7</b>
2.1	<i>Einteilung der Einzelmolekülgrößen nach deren Ensemblebezug</i>	7
2.2	<i>Zustands- und Prozeßgrößen</i>	10
2.3	<i>Einteilung und Beschreibung dynamischer Phänomene</i>	11
2.3.1	Intensitätsdynamik	13
2.3.2	Spektrale Dynamik	16
2.3.2.1	<i>Die Verschiebung der spektralen Lage („S1-Prozeß“)</i>	16
2.3.2.2	<i>Die Variation der Franck-Condon-Faktoren („S2-Prozess“)</i>	18
2.3.2.3	<i>Die Änderung der Spreizung der Schwingungsprogression („S3-Prozeß“)</i>	21
2.3.2.4	<i>Variationen in der Auflösung der Progression („S4-Prozeß“)</i>	21
2.4	<i>Der Aufbau des Ensembles</i>	22
2.4.1	Inhomogene Verbreiterung und Reproduzierbarkeit	22
2.4.2	Subensemble	23
2.5	<i>Methoden zur statistischen Auswertung</i>	24
2.5.1	Verteilungsfunktionen	24
2.5.2	Korrelation von Fluoreszenzeigenschaften	29
2.5.3	Koinzidenzen von Einzelmolekülphänomenen	30
2.5.3.1	<i>Zeitliche Häufung bei einem Molekül</i>	30
2.5.3.2	<i>Häufungen spektraler Phänomene an einzelnen Molekülen</i>	32
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>33</b>
3.1	<i>Ensemblemessungen</i>	34
3.2	<i>Einzelmolekülexperimente</i>	36
3.2.1	Das konfokale Mikroskop	36
3.2.2	Probenpräparation	39
3.2.3	Messung & Datenverarbeitung	42
<b>4</b>	<b>Ensembleexperimente</b>	<b>45</b>

---

<b>4.1</b>	<b><i>Vergleich des spektralen Verhaltens in Toluol und Polystyrol</i></b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b><i>Quantitative Charakterisierung der Spektren</i></b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Das Fluoreszenzspektrum von API in Abhängigkeit von <math>\lambda_{EX}</math></i></b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b><i>Protonierung der 9-Aminogruppe des API</i></b>	<b>52</b>
<b>4.5</b>	<b><i>Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses der Konformere</i></b>	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b><i>Einzelmolekülspektroskopie</i></b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Experimente mit <math>\lambda_{EX} = 514,5nm</math></i></b>	<b>59</b>
5.1.1	<i>Zusammenfassung</i>	68
<b>5.2</b>	<b><i>Experimente mit <math>\lambda_{EX} = 488 nm</math></i></b>	<b>69</b>
5.2.1	<i>Vergleich von Summen- und Ensemblespektrum</i>	69
5.2.2	<i>Die Verteilungsfunktionen der spektralen Parameter</i>	71
5.2.2.1	<i>Verteilungsfunktionen von PI</i>	73
5.2.2.2	<i>Verteilungsfunktionen von DAPI</i>	76
5.2.2.3	<i>Verteilungsfunktionen von PIBr<sub>3</sub></i>	78
5.2.2.4	<i>Vergleich zwischen den Farbstoffen</i>	80
5.2.3	<i>Korrelationen zwischen den Fluoreszenzparametern</i>	83
5.2.3.1	<i>Spektrale Lage / Intensität</i>	83
5.2.3.2	<i>Spektrale Lage / Bandenverhältnis</i>	88
5.2.4	<i>Spektrale Dynamik</i>	90
5.2.4.1	<i>Spektrale Diffusion</i>	92
5.2.4.2	<i>Spektrale Sprünge</i>	99
5.2.5	<i>Spezielle Fallstudien</i>	106
5.2.5.1	<i>Übergänge</i>	106
5.2.5.2	<i>Diffusion</i>	115
5.2.6	<i>Zusammenfassung</i>	120
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung &amp; Ausblick</i></b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b><i>Appendix</i></b>	<b>131</b>
<b>7.1</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>131</b>
<b>7.2</b>	<b><i>Auswertung der Ensemblespektren</i></b>	<b>135</b>
7.2.1	<i>Spektren in Toluol</i>	135
7.2.2	<i>Spektren in Polystyrol</i>	137
7.2.3	<i>Gegenüberstellung der Resultate</i>	139
<b>7.3</b>	<b><i>Temperaturprofil um einen konstant beleuchteten Chromophor</i></b>	<b>142</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Eine kleiner historischer Exkurs

1802 entdeckte der englische Mineraloge W. Wollaston erstmals sieben dunkle Linien im Sonnenspektrum, die er fälschlicherweise für Trennlinien zwischen den Spektralfarben hielt. Darüber hinaus wurde dieser Entdeckung weder von ihm selbst, noch von der Fachwelt sonderliche Beachtung geschenkt. Fünf Jahre später fand J. Fraunhofer mit einem sehr viel besseren Spektroskop über fünfhundert Linien im Sonnenspektrum, die offensichtlich keine Trennlinien sein konnten. 1814 berichtete Fraunhofer über ähnliche Linien in den Spektren heller Fixsterne, die jedoch von denen der Sonne substantiell abwichen. Es spricht für ihn, daß er sich zu diesem Zeitpunkt nicht zu Spekulationen über die Ursache dieser Linien hinreißen ließ.

In den folgenden Jahren wurden in den Laboren viele Erkenntnisse über Emissionslinien aus Flammen und Entladungslampen, sowie Absorptionslinien von Gasen gewonnen, viele Theorien aufgestellt und Auseinandersetzungen zwischen Vertretern dieser Theorien geführt. Viele der in diesem Zusammenhang nennenswerten Namen sind heute selbst dem interessierten Laien ein Begriff (Wenn auch meist in anderem Kontext): F. Talbot, A. H. Fizeau, L. Foucault, D. Brewster, E. Bequerel, G. Stokes, A. J. Angström und viele andere. Die entscheidenden Erkenntnisse jedoch, wie die Äquivalenz der Ursachen von Emissions- und Absorptionslinien von Gasen, das Strahlungsgesetz und die Zuordnung solarer Absorptionslinien zu chemischen Elementen wurden allesamt von G. R. Kirchhoff und R. Bunsen beigetragen. Charakteristisch für alle diese Arbeiten war, daß ein astronomisches Phänomen, dessen Rahmenbedingungen unbekannt und unzugänglich waren, durch Modellexperimente im Labor simuliert werden konnten, was schließlich zur korrekten Deutung der Phänomene führte.

Um 1863 wurde von Wissenschaftlern wie G. Airy, G. B. Donati, L. M. Rutherford, W. Huggins und A. Secchi mit der systematischen Vermessung von Sternspektren begonnen, um repräsentative Aussagen über wiederkehrende Merkmale und allgemeingültige Tendenzen in der zunächst verwirrenden Vielfalt stellarer Spektren möglich zu machen. Da über das Zustandekommen der individuellen Spektrenformen, sowie deren drastische Abweichungen untereinander keinerlei

physikalische Theorien existierten, ergab sich die Notwendigkeit einer rein phänomenologischen Beschreibung und Klassifikation. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts konkurrierten mehrere Klassifikationssysteme miteinander: Frühe grobe Einteilungen nach Secchi und H. C. Vogel (jeweils 3 Klassen), und diffizilere, wie die von E. Pickering (13 Klassen) und A. C. Maury (22 Klassen, zweidimensional). Schließlich setzte sich die Klassifikation von A. Cannon durch, die auf der von Pickering beruht. Sie unterteilt die Sterne in die Spektralklassen O, B, A, F, G, K, M, die jeweils noch einmal dezimal abgestuft wurden. In der angegebenen Reihenfolge verändern sich die Linienstärken aller beobachteten Absorptionslinien stetig. Auch ohne Kenntnis der physikalischen Hintergründe war das ein starkes Argument für das Zutreffen der Sequenz. Es wurde (richtigerweise) vermutet, daß mit der Sequenz von O nach M die Oberflächentemperatur abnimmt, und weiterhin (fälschlicherweise), daß in gleicher Richtung das Alter steigt. Mit dieser Klassifikation war die Grundlage für ausgedehnte statistische Auswertungen stellarer Spektren gelegt.

Es wurden nachfolgend die Verteilungsfunktion der Sterne über die Spektralklassen, sowie die Verteilung der Spektralklassen in verschiedenen Bereichen der Milchstraße durch H. Shapley ermittelt. Durch die Bestimmung der Dopplerverschiebungen von Spektrallinien wurde der Zerfall der Gesamtheit der Sterne unserer Galaxie in zwei Subpopulationen mit unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten und spektralen Eigenschaften von J. H. Oort nachgewiesen. Erste Erkenntnisse über die absoluten Helligkeiten der Sterne verschiedener Spektralklassen erhielt E. Hertzsprung 1905 durch die anhand von Eigenbewegungen gewichteten Mittel der scheinbaren Helligkeiten von Sternen. Er war es auch, der 1911 das erste Farb/Helligkeits-Diagramm und die darin sichtbare „Hauptreihe“ beschrieb. Unabhängig davon entwickelte H. N. Russell 1913 ein Korrelationsdiagramm zwischen absoluter Helligkeit und der Spektralklasse, in der sich ebenfalls die beschriebene Hauptreihe fand, sowie eine Subpopulation extrem heller Sterne ohne signifikante Korrelation [1]. Die Sterne der Hauptreihe werden seitdem gewöhnlich als „Zwerge“, die des abweichenden Subensembles als „Riesen“ bezeichnet. Aus den Korrelationsdiagrammen der beiden entstand das berühmte „Hertzsprung-Russell-Diagramm“. Arbeiten wie diese stellen den Anfang der modernen Astrophysik dar. Zusammen mit der in etwa zeitgleichen Entdeckung der atomaren Struktur durch E. Rutherford und N. Bohr, der

Strahlungsformel von M. Planck und der Quantennatur des Lichts, sowie der Relativitätstheorie durch A. Einstein ebneten sie den Weg für eine theoretische Beschreibung der Sternentwicklung (Quellen: [1][2][3]).

Rückblickend lassen sich die wissenschaftlichen Prinzipien erkennen, die zur Entstehung der modernen Astrophysik führten: Eine neue experimentelle Technik erlaubte Einblicke in zuvor unzugängliche Bereiche der Natur. Umfangreiche Messungen lieferten die Basis für eine repräsentative Auswertung der beobachteten Phänomene. Dazu wurden diese zunächst adäquat beschrieben und definiert. Die angepaßte Beschreibung erlaubte nun eine sinnvolle Klassifikation der Meßdaten, und diese schließlich deren statistische Analyse. Obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Kenntnisse über den physikalischen Hintergrund einbezogen wurden, also rein phänomenologisch gearbeitet wurde, ließen sich bereits allgemeingültige, systemspezifische Aussagen ableiten. Der physikalische Hintergrund wurde durch Einflüsse aus anderen wissenschaftlichen Disziplinen, theoretische Arbeiten und angepaßte Modellexperimente, die die eigentlich untersuchten Objekte im Labor simulierten, zugänglich.

Durch die Verfügbarkeit extrem schmalbandiger Laser, hochempfindlicher Detektoren (APD / SPAD: Avalanche Photo Diode / Single Photon Avalanche Diode) und nanometergenauer Positionierung gelang 1989 erstmals die spektroskopische Untersuchung einzelner fluoreszierender Farbstoffmoleküle bei kryogenen Temperaturen durch Moerner et. al. [4], 1993 auch bei Raumtemperatur durch Betzig et. al. [5]. Dabei wurden sowohl beugungsbegrenzte, als auch nahfeldoptische Mikroskopietechniken eingesetzt. Die untersuchten Farbstoffmoleküle wurden durch Einbetten in kristalline [4][6] oder amorphe [7][8] Umgebungen immobilisiert. Durch die Umgehung der für eine Ensemblemessung charakteristischen Ausmittelung wurden nun die individuellen Eigenschaften von einzelnen quantenmechanischen Systemen direkt sichtbar. Wiederum erschloß sich eine Vielzahl neuer, bisweilen unerwarteter und zum Teil bis heute nicht voll verstandener Phänomene.

Die hier vorliegende Arbeit stellt nun den Versuch dar, die auf Einzelmolekülebene beobachtbaren Erscheinungen phänomenologisch zu beschreiben und zu klassifizieren, statistische Auswertung zu betreiben und schließlich zu für das Ensemble repräsentativen, und somit für die untersuchte Probe spezifischen Resultaten zu gelangen.

## **1.2 Ziele & Konzepte**

Die Streuung von Meßwerten in der Einzelmolekülspektroskopie ist ein weithin bekanntes Phänomen, das als inhomogene Verbreiterung bezeichnet wird. Die Auflösung des Ensembles in einzelne Moleküle bietet die Möglichkeit, molekulares Verhalten unter Umgehung der inhomogenen Verbreiterung direkt zu untersuchen. Es zeigt sich, daß die Fluoreszenzspektren einzelner Moleküle schmalbandiger als das Ensemblespektrum sind, aufgrund ihrer unterschiedlichen Umgebung voneinander abweichen und verschiedenartige spektrale Dynamik aufweisen. Während die zeitliche Verfolgung der Fluoreszenzintensität und die Auswertung dieser Intensitätstrajektorien mittlerweile Routine sind [8][9][10], wie beispielsweise per Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie [11], ist die Aufnahme spektraler Sequenzen mit hoher Zeitauflösung experimentell anspruchsvoll, erlauben jedoch viel weitergehende Aussagen. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete experimentelle Aufbau ermöglicht die Aufnahme von Einzelmolekülspektren hoher Qualität bei Integrationszeiten um 1s. Die eingesetzten Farbstoffe weisen eine sehr gut aufgelöste Schwingungsfinestruktur mit bis zu vier erkennbaren vibronischen Banden in Fluoreszenzspektrum einzelner Moleküle auf. In Kombination erlaubt das eine detaillierte phänomenologische Beschreibung der spektralen Eigenschaften und Dynamik anhand von Parametern mit direktem molekülphysikalischen Bezug. Diese Beschreibung und die darauf aufbauende Klassifikation spektraldynamischer Phänomene ist einer der Schwerpunkte dieser Arbeit. Diese soll so angelegt sein, daß sie auf beliebige Farbstoff/Matrix-Systeme übertragbar ist.

Das die individuellen Eigenschaften eines einzelnen Moleküls unabhängig von dem Verhalten der anderen Teilchen der inhomogenen Gesamtheit ermittelt werden, bedeutet im Umkehrschluß die Nichtübertragbarkeit von Erkenntnissen von einem Molekül auf das andere. Wissenschaftlich angestrebt werden jedoch reproduzierbare Studien, die für die Gesamtheit repräsentative, und somit für das untersuchte System spezifische Aussagen ermöglichen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist daher, die einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen jeweils an umfangreichen, repräsentativen Querschnitten des Ensembles durchzuführen. Auf diese Weise werden Erkenntnisse über das Ensemble gewonnenen, die im direkten Ensembleexperiment nicht zugänglich sind.

In bisherigen Studien im Rahmen der Einzelmolekülmikroskopie/-spektroskopie wurden statistische Methoden zur Analyse einzelner Phänomene herangezogen oder zur Stützung zuvor aufgestellter Modelle bemüht [12][13][14][15]. Dabei werden zumeist nur einzelne Parameter ausgewertet, Zustandsgrößen und solche, die spektrale Dynamik beschreiben, isoliert betrachtet. Hier soll der Weg andersherum beschritten werden: Eine möglichst geschlossene, rein phänomenologische Beschreibung der untersuchten Farbstoff/Matrix-Systeme soll durch statistische Auswertung erreicht werden. Dabei sollen sowohl statische, als auch dynamische Eigenschaften behandelt und etwaige Zusammenhänge zwischen diesen erkennbar gemacht werden. Anschließend an die phänomenologische Beschreibung und die statistische Analyse erfolgen gegebenenfalls Interpretationen und deren Verifizierungen anhand der durch Ensembleexperimente gewonnenen Ergebnisse.

Einige konkrete Fragestellungen der statistischen Auswertung lauten:

- Wie sehen die Verteilungsfunktionen der protokollierten Einzelmolekülgrößen aus? Treten diskrete Häufungen in den Verteilungsfunktionen auf, die auf den Zerfall des Ensembles in Subensemble hindeuten? Wie verhält sich der Mittelwert zum Ensemblewert?
- Sind diese Größen untereinander korreliert?
- Unterscheiden sich die Verteilungsfunktionen zu einer Meßgröße über die Spektren eines Molekül und einer definierten Anzahl von Spektren aller Moleküle (Herrscht also ergodisches Verhalten)?
- Wie sehen die Verteilungsfunktionen der dynamischen Eigenschaften aus (Sprungweiten, Bandbreite der spektralen Diffusion, Aufenthaltsdauern in spektroskopisch nachweisbaren Zuständen, etc.)? Häufen sich beispielsweise die Sprungweiten einer Meßgröße um einen Wert?
- Findet sich in dem Fall dieser Wert als Abstand zweier Häufungen in der Verteilungsfunktion der assoziierten statische Meßgröße wieder?
- Sind diese Prozeßgrößen miteinander korreliert?
- Existieren Korrelationen zwischen statischen und dynamischen Eigenschaften?
- Gibt es Häufungen von Einzelmolekülphänomenen (Koinzidenzen) pro Zeitfenster in einer Sequenz?



## 2 Theoretischer Teil

Die Eigenschaften einer makroskopischen Probe werden bestimmt durch die Eigenschaften der sie aufbauenden Teilchen, sowie die Verteilung dieser Größen. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von Farbstofflösungen (fest oder flüssig) liefert Informationen über die Eigenschaften des Farbstoffs, während die Matrix der Messung unzugänglich bleibt. Jedoch übt die lokale Umgebung der Fluorophore Einfluß auf deren spektrales Verhalten aus. Auch wenn die Matrix also nicht zum Meßsignal beiträgt, kann das spektrale Verhalten nicht unabhängig von dieser behandelt werden. Das gilt für Einzelmolekülmessungen in gleichem Maße wie für solche am Ensemble. Es ist daher zweckmäßig, das Ensemble in diesem Fall als die Gesamtheit von Supermolekülen aufzufassen, die sich jeweils aus dem Farbstoffteilchen und seiner wechselwirkenden Umgebung zusammensetzen. Im Folgenden soll sich der Begriff „Molekül“ auf diese Supermoleküle beziehen. Das isolierte Solvendum soll explizit als Farbstoffmolekül oder, je nach betrachtetem Vorgang, als Chromophor, respektive Fluorophor bezeichnet werden.

### 2.1 Einteilung der Einzelmolekülgrößen nach deren Ensemblebezug

Um die Zusammenhänge zwischen denen für die Einzelmoleküle ermittelten Meßwerte und den Ensembleobservablen zu beschreiben, soll folgendes hypothetisches Experiment betrachtet werden: Eine Probe, bestehend aus  $N$  Farbstoffmolekülen in fester Lösung, wird zunächst makroskopisch im Hinblick auf die Meßgrößen  $Q$  untersucht. Dabei sollen für alle Moleküle identische äußere Bedingungen, wie Lichtstärke und Polarisation, gelten. Dann werden, unter den gleichen Bedingungen wie im Ensembleexperiment bezüglich Anregungswellenlänge und -intensität, die entsprechenden Meßgrößen  $q$  für jedes einzelne Molekül ermittelt. Alle Meßwerte seien fehlerfrei. Da jedes Einzelmolekülkrement gewichtet in den Ensemblemeßwert  $Q$  eingeht, ist es erforderlich, auch die Einzelmolekülmeßwerte  $q$  bei der Bildung von Mittelwerten nach den im Ensemble gültigen Kriterien mit einem normierten Faktor  $c_n$  zu gewichten.

$$Q = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N c_n q_n \quad (2.1)$$

Nun wird für jede Größe überprüft, ob der Ensemblewert dem arithmetischen Mittel der Einzelmolekülwerte entspricht. Es zeigt sich, daß nur ein Teil der aus dem Fluoreszenzsignal zugänglichen Parameter durch arithmetische Mittelung zum Ensemblewert führen. Dazu gehören Quantenausbeuten aller Art  $\phi_i$  und das Fluoreszenzspektrum selbst. Im Fall der Quantenausbeuten werden die Einzelmolekülbeiträge anhand der absorbierten Leistungen gewichtet. Das Kriterium zur Gewichtung der Fluoreszenzspektren ist deren Intensität. So werden auf die Fläche normierte Spektren anhand ihrer tatsächlichen integralen Intensität, auf Maximum normierte Spektren anhand ihrer tatsächlichen Maximalintensität, Rohspektren hingegen gar nicht gewichtet. Eine weitere Größe mit arithmetischer Korrespondenz zwischen  $Q$  und den  $q_n$  ist der spektrale Schwerpunkt  $\lambda_\emptyset$ , dessen Linearkoeffizient  $c_n$  ebenfalls durch die integrale Intensität bestimmt wird.

Parameter, die durch Auswertung des Fluoreszenzsignals gewonnen werden, zeigen diese arithmetische Korrespondenz nur, solange sich der Algorithmus der Auswertung  $F$  und die Mittelung zueinander kommutativ verhalten. Ist das nicht der Fall, wirkt sich die Reihenfolge der Schritte auf das Ergebnis aus:

$$Q = F\left(\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N q_n\right) \neq \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N F(q_n) \quad (2.2)$$

Das Mittel von Einzelmolekülwerten der aus dem Fluoreszenzsignal abgeleiteten Größe  $q$  stimmt hier nicht mehr mit der analog abgeleiteten Größe  $Q$  des Ensembles, dem die Mittelung immanent ist, überein. Vielmehr stellt es den Schwerpunkt einer Verteilung dar. Auch die Einführung von Gewichtungsfaktoren ändert daran nichts. Da es für diese Größen keine sinnvolle Möglichkeit gibt, den Ensemblemeßwert aus den Meßwerten der Einzelmoleküle zu konstruieren, lassen diese Größen keinen Vergleich zwischen mikroskopischen und makroskopischen Ergebnissen zu. Zugänglich sind jedoch die Verteilungsfunktionen dieser Größen, die Einblicke in das Verhalten von Fluorophor und Matrix erlauben, die Ensemblemessungen vorenthalten sind. Im allgemeinen fallen in diese Kategorie signifikante Punkte eines Datensatzes und Parameter von Fitfunktionen, die auf den untersuchten Datensatz angewandt wurden. Typische Vertreter hierfür sind die Wellenlänge und die Intensität spektraler Maxima.

Gehen in den Auswertungsalgorithmus mehrere molekulare Parameter ein, beispielsweise als Differenz oder Quotient, so enthält die resultierende Größe einen intrinsischen Bezug. In Ensembleexperimenten geht dieser individuelle Bezug verloren:

$$\bar{q} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N F(q_n^1, q_n^2, \dots) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N q_n \neq \quad (2.3)$$

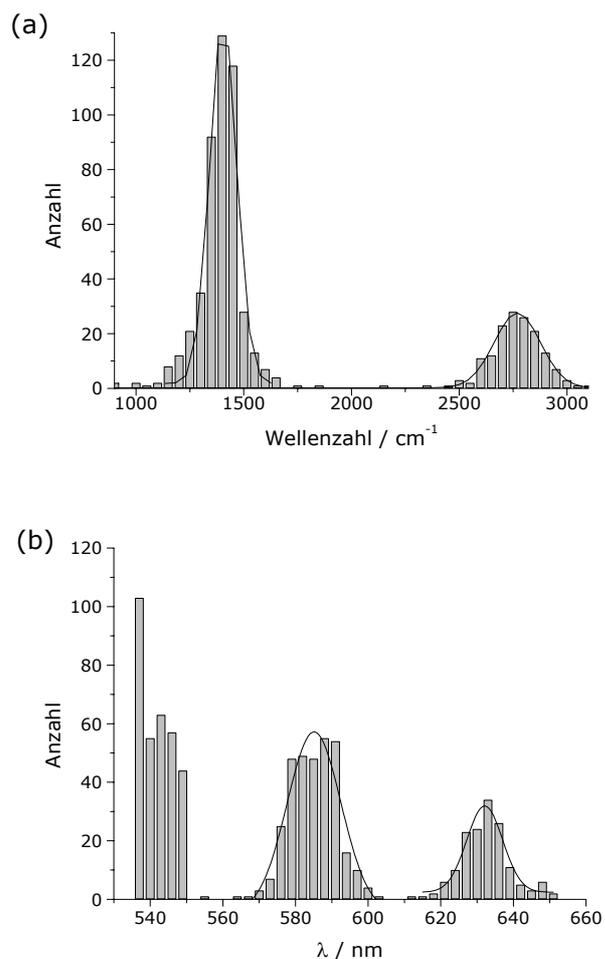
$$Q = F(Q^1, Q^2, \dots)$$

Ist die Streuung der eingehenden Parameter  $q_n^i$  gering, so läßt sich aus dem Ensemble eine qualitativ vergleichbare Größe  $Q$  gewinnen, die jedoch nicht dem Mittelwert der Einzelmolekülgrößen  $q$  entspricht. Dies ist beispielsweise der Fall für die energetischen Abstände der Schwingungsprogression im Fluoreszenzspektrum, sowie für das Intensitätsverhältnis der vibronischen Banden. Jedoch ist insbesondere bei Größen, die die dynamischen Eigenschaften einzelner Moleküle beschreiben, keine Entsprechung im Ensemble zu finden. So ist eine spektrale Verschiebung  $\Delta\lambda$  an Einzelmolekülen beobachtbar, während sich im Ensemble die Einzelbeiträge  $\Delta\lambda_n$  jederzeit aufheben und das Spektrum unverändert bleibt. Eine Änderung in der Orientierung des Übergangsdipolmoments ist eine bekannte Erscheinung auf Einzelmolekülebene, in einer amorphen Probe jedoch sind diese Orientierungen und deren Änderungen zufallsverteilt. Die Mittelung im Zuge einer makroskopischen Messung dieser Größe führt zu keinem physikalisch sinnvollen Resultat. Zudem ist die Dynamik einzelner Moleküle voneinander unabhängig, so daß das Ensemblemittel der zeitlichen Verläufe von Einzelmolekülparametern zeitunabhängig ist.

Auch in diesem Fall ist ersichtlich, daß es kein sinnvolles Verfahren gibt, den Ensemblewert aus den Einzelmolekülbeiträgen zu konstruieren, sofern es diesen überhaupt gibt. Gerade deshalb ist die Ermittlung dieser Größen interessant. Durch den Erhalt des intrinsischen Bezugs für jedes Molekül fallen die absoluten Beiträge der Streuung weg und nur die relative Streuung der eingehenden Parameter zueinander bleibt erhalten. Die Verteilungsfunktionen dieser Größen weisen daher schmalbandigere und diskretere Akkumulationen auf. Am Beispiel eines Histogramms der energetischen Abstände in der Schwingungsprogression eines Fluoreszenzfarbstoffs ist dies in Abbildung 2.1 verdeutlicht. Die Verteilung der

relativen Größen und deren Mittelwerte können somit zu Erkenntnissen über das Ensemble führen, die einer Ensemblemessung gar nicht, oder nur verfälscht zugänglich sind. Zum Beispiel lassen sich für ein System aus Farbstoff und Matrix spezifische Aussagen über das dynamische Verhalten des Spektrums, der Fluoreszenzintensität und der lateralen Orientierung machen, sowie einen genaueren Einblick in den molekularen Phasenraum des Farbstoffs gewinnen.

Abbildung 2.1: Histogramme der energetischen Abstände in den Schwingungsprogressionen von 322 Einzelmolekülspektren (a) und der Schwingungsbandenmaxima der selben Spektren (b) [16]. Im oberen Histogramm wird die erste Akkumulation aus den Abständen zwischen den vibronischen Niveaus 0 und 1, sowie 1 und 2 gebildet, die Zweite aus dem Abstand zwischen 0 und 2. Im unteren Histogramm lassen sich die Häufungen direkt den Wellenlängen der einzelnen Bandenmaxima zuordnen. Der auffällig hohe Wert bei  $\lambda = 536\text{nm}$  wird durch einen systematischen Fehler bei der Spektrenaufnahme verursacht.



Die Abstände der Akkumulationen untereinander betragen in beiden Histogrammen  $\sim 1400\text{cm}^{-1}$ . Die Halbwertsbreiten der angefitzten Gaußfunktionen ergeben sich zu  $152$  und  $255\text{cm}^{-1}$  im oberen Fall, zu  $308$  und  $492\text{cm}^{-1}$  im Unteren. Somit weist die Relativgröße nur ungefähr die Hälfte der Streuung auf, welche die in sie eingehenden Parameter zeigen.

## 2.2 Zustands- und Prozeßgrößen

In Anlehnung an den Gebrauch der Begriffe in der Thermodynamik lassen sich die die Einzelmolekülfluoreszenz beschreibenden Parameter in Zustands- und

Prozeßgrößen unterteilen. Die Zustandsgrößen, wie das Fluoreszenzspektrum selbst und die daraus abgeleiteten Parameter, die Intensität und die Fluoreszenzlebensdauer, charakterisieren die Fluoreszenz zu jedem Zeitpunkt. Daß die Messung dieser Eigenschaften einen nicht verschwindenden Zeitraum erfordert, spielt in dieser grundsätzlichen Betrachtung keine Rolle. Zumindest existiert für diese Größen zu jedem Zeitpunkt ein Erwartungswert.

Die Prozeßgrößen beschreiben Änderungen im Fluoreszenzzustand und sind somit zur Charakterisierung der Fluoreszenzdynamik geeignet. Solche Änderungen können eine oder mehrere Zustandsgrößen betreffen. Typische Beispiele für Prozeßparameter sind Sprungweiten spektraler Eigenschaften und Aufenthaltszeiten in diversen Zuständen. Gemäß ihrer Definition sind diese Größen im Gegensatz zu den Zustandsgrößen nicht zu jedem Zeitpunkt definiert, sondern nur für den Fall dynamischer Phänomene. Da jeweils Anfangs- und Endwerte aufeinander bezogen werden, sind Prozeßparameter allesamt Relativgrößen im Sinne von Abschnitt 2.1 und daher den Einzelmoleküluntersuchungen vorbehalten.

### **2.3 Einteilung und Beschreibung dynamischer Phänomene**

Um die dynamischen Erscheinungen, die in der Fluoreszenz einzelner Moleküle sichtbar werden, der wissenschaftlichen Diskussion und Interpretation zugänglich zu machen, ist es sinnvoll, die auftretenden Phänomene voneinander abzugrenzen und begrifflich zu beschreiben. Eine grundlegende Einteilung der dynamischen Phänomene erfolgte anhand zweier Kriterien [16]:

- (1) *Die Ausprägung der Veränderung* ordnet eine fluoreszenzdynamische Erscheinung entweder den *Intensitätsfluktuationen* oder den *spektralen Fluktuationen* zu. Intensitätsdynamik wirkt sich ausschließlich auf die Fluoreszenzrate des untersuchten Moleküls aus, nicht jedoch auf die Lage oder die Form des Spektrums. Im Gegensatz dazu wird jegliche Änderung in Form oder Lage des Spektrums als spektrale Dynamik bezeichnet. Diese ist zumeist von einer Änderung der Fluoreszenzrate begleitet.
- (2) *Die zeitliche Verteilung einer veränderlichen Größe* ordnet eine fluoreszenzdynamische Erscheinung entweder den *übergangsartigen Prozessen* oder den *diffusionsartigen Prozessen* zu (Abbildung 2.2). Akkumulationen von

Observablen um mehrere diskrete Werte bei der zeitlichen Verfolgung einer Meßgröße kennzeichnen übergangsartige Vorgänge. Ein einzelner Übergang wird auch als *Sprung* bezeichnet. Ein diffusionsartiger Prozeß zeichnet sich durch eine statistische Verteilung der gemessenen Observablen aus. Je nach den Randbedingungen lassen sich solche Verteilungen oft durch Gauß-, Poisson- oder Exponentialfunktionen beschreiben.

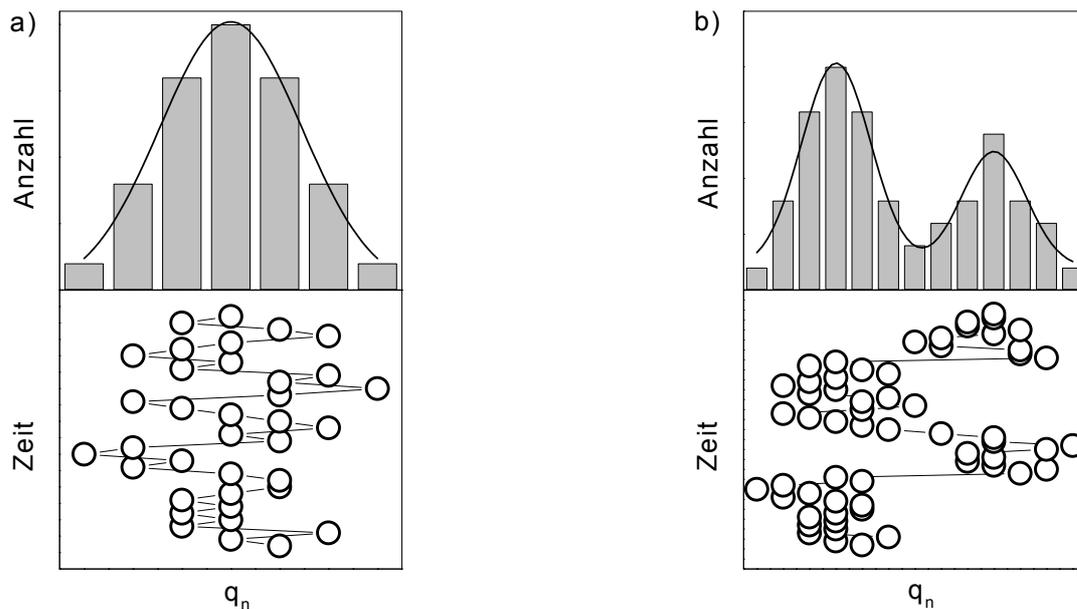


Abbildung 2.2: (a) Beispielhafter zeitlicher Verlauf einer diffusionsartig fluktuierenden Meßgröße. Das zugehörige Histogramm läßt sich durch eine Gaußfunktion anfitzen. (b) Analoger zeitlicher Verlauf einer übergangsartig fluktuierenden Meßgröße, dem ein Diffusionsprozeß überlagert ist. Während des Beobachtungszeitraums finden drei Sprünge statt. Im zugeordneten Histogramm sind zwei Häufungen zu erkennen. Die angefittete Funktion ist eine Summe aus zwei Gaußfunktionen.

Die experimentellen Grenzen dieser Unterscheidung sind gezogen durch die meßtechnische Zeitauflösung und die Auflösung in der Dimension der Observable, sowie durch das natürliche und apparative Rauschen. Die Einteilung der Fluoreszenzdynamik ist in Abbildung 2.3 noch einmal zusammengefaßt.

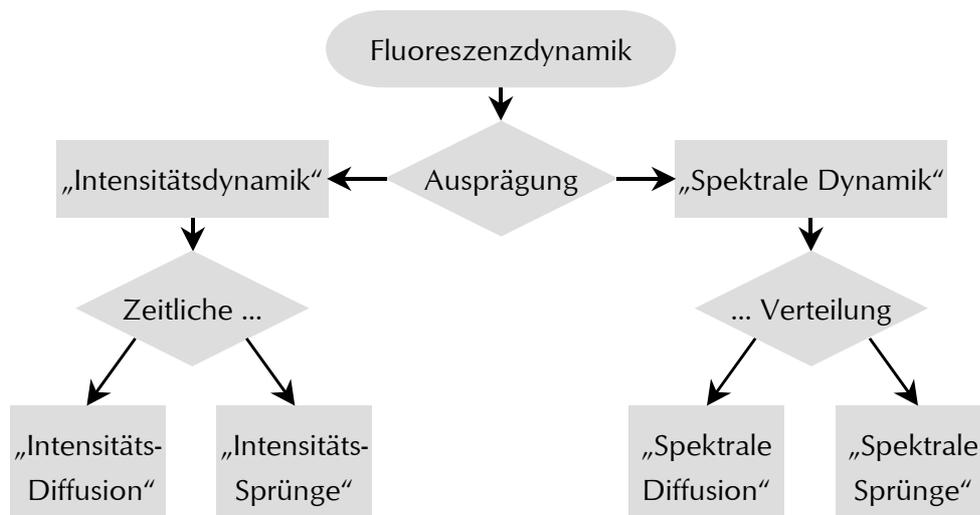


Abbildung 2.3: Schema der Einteilung fluoreszenzdynamischer Erscheinungen. Die Bezeichnung der übergangsartigen Dynamik als Sprung bezieht sich auf eine einmalige Beobachtung des Phänomens.

### 2.3.1 Intensitätsdynamik

Aus Messungen des zeitlichen Verlaufs der Gesamtfluoreszenzrate einzelner Moleküle sind Intensitätsschwankungen aller Art bekannt [9], [17]. Je nach Zeitkonstante und Intensitätsprofil der beobachteten Phänomene wurden Begriffe wie „Blinking“ [17], [18] oder „Reversible Photobleaching“ [19] zur Beschreibung bemüht. Abbildung 2.4 und Abbildung 2.5 zeigen typische Intensitätstrajektorien, die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden. Da bei der Messung der Gesamtintensität jegliche spektrale Information verloren geht, lässt sich nicht mehr entscheiden, ob eine Intensitätsänderung mit einem spektralen Effekt verknüpft ist. Auf diese Weise ist es beispielsweise nicht möglich, einen Sprung in der Fluoreszenzquantenausbeute von einer spektralen Verschiebung mit einhergehender Veränderung der Anregungsrate zu unterscheiden. Diese Möglichkeit wird eröffnet durch die simultane spektrale und zeitliche Auflösung zu spektralen Sequenzen. Hier lassen sich reine Änderungen der Fluoreszenzrate von spektralen Erscheinungen abtrennen und separat diskutieren.

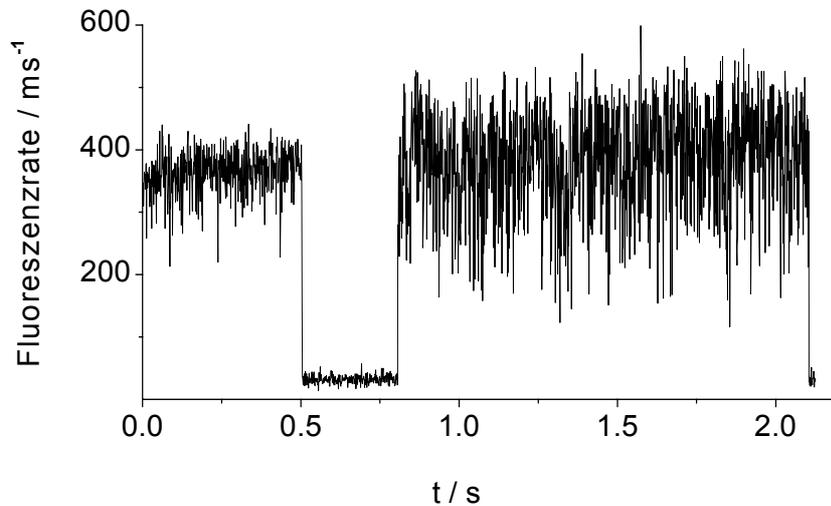


Abbildung 2.4: Ausschnitt aus der Intensitätstrajektorie eines Moleküls mit unterschiedlichem Diffusionsverhalten. Anfänglich zeigt die Intensität Diffusion in einer Größenordnung von  $\sim \pm 50 \text{ ms}^{-1}$ . Bei 0,5 Sekunden springt das Molekül in einen quasi nicht strahlenden Zustand um nach 0,3 Sekunden nahezu auf das vorherige Fluoreszenzniveau zurückzukehren. Jedoch zeigt die Diffusion der Intensität nun eine Bandbreite von  $\sim \pm 130 \text{ ms}^{-1}$ . Im Histogramm ist die Verteilung der Intensität vor dem Dunkelzustand schwarz, die der danach grau dargestellt (Schrittweite:  $24 \text{ ms}^{-1}$ ).

Für die Einteilung ist es unerheblich, ob die beobachteten Intensitätsschwankungen nur zwischen fluoreszierenden Zuständen stattfinden oder auch den Meßwert Null mit einbeziehen. Es werden also unter dem Begriff „Intensitätssprung“ auch Übergänge in nicht fluoreszierende, sogenannte Dunkelzustände verstanden.

Über die Ursachen von Intensitätsdiffusion und -sprüngen wurden viele Spekulationen angestellt. Recht plausibel zur Erklärung der Intensitätsdiffusion erscheint die Fluktuation des Winkels zwischen einfallendem Anregungslicht und Übergangsdipolmoment durch Rotationsbewegungen des Farbstoffmoleküls [19], [20]. Bei geringen Photonenzählraten fluktuiert die Intensität gemäß der Poissonstatistik. Deren Standardabweichung ist die Wurzel der mittleren Zählrate. Fluktuationen in der Größenordnung dieser Standardabweichung werden also nicht durch molekulare Vorgänge verursacht, sondern durch Photonenstatistik.

Intensitätssprünge in Zustände mit Lebensdauern im Submillisekundenbereich werden überwiegend dem „Intersystem Crossing“ in den Tripletzustand zugeschrieben [21], [10]. Weitgehend ungeklärt jedoch sind weiterhin Dunkelzustände von bis zu einigen Sekunden Dauer. In diesen Fällen sind echte chemische Veränderungen des Fluorophors oder Wechselwirkungen mit diffusionsfähigen Verunreinigungen der Matrix denkbar. Da die genaue Beschaffenheit der Umgebung des Farbstoffmoleküls jedoch unbekannt ist, lässt sich insbesondere bei singulären Beobachtungen keine gesicherte Interpretation erreichen.

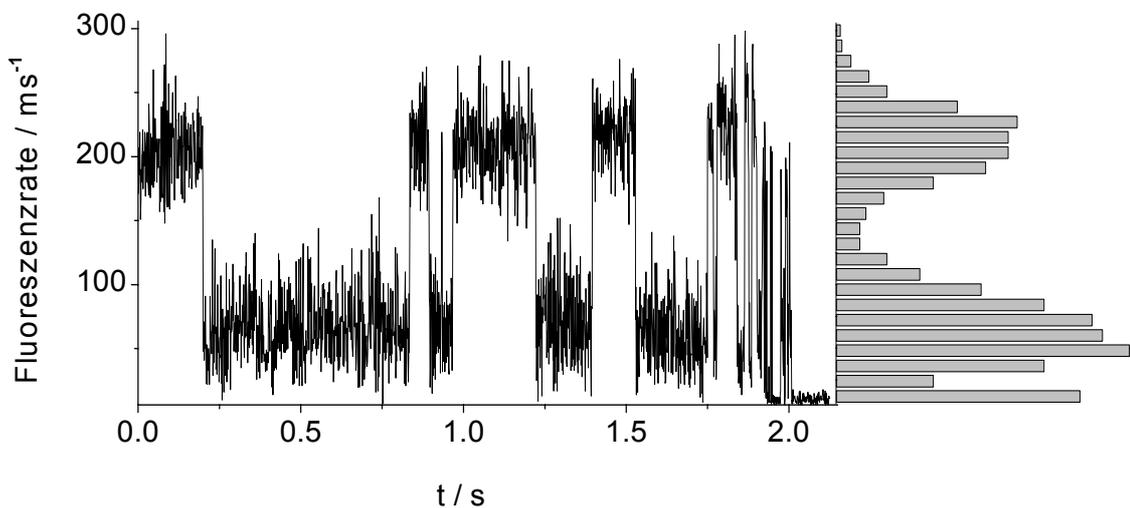


Abbildung 2.5: Ausschnitt aus der Intensitätstrajektorie eines Moleküls, das Übergänge zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Fluoreszenzrate zeigt. Die Zählrate des helleren Zustands beträgt  $\sim 210\text{ms}^{-1}$ , die des weniger intensiven  $\sim 50\text{ms}^{-1}$ . Nach zwei Sekunden Beobachtungszeit erfolgt die Photozerstörung des Farbstoffmoleküls. Das Histogramm der Intensitäten (Schrittweite:  $12\text{ms}^{-1}$ ) weist zwei klar getrennte Akkumulationen auf. Anhand dieser Darstellung ist jedoch nicht zu entscheiden, ob es sich um einen spektralen Übergang oder einen Intensitätsübergang handelt.

### 2.3.2 Spektrale Dynamik

Die in dieser Arbeit angewandte Phänomenologie der spektralen Erscheinungen basiert auf der separierten Betrachtung des Verhaltens von Parametern, die üblicherweise zur Beschreibung von Spektrenformen benutzt werden: Die spektrale Lage der Fluoreszenzmaxima  $\lambda_{\max}$  (und damit der  $S_0$ - $S_1$ -Abstand), das Verhältnis der Intensitäten der Schwingungsbanden  $\Phi_{kl}$  (und damit das Verhältnis der Franck-Condon-Faktoren  $F_{ak}^2/F_{al}^2$ ) und die Übergangswellenzahlen zwischen den Schwingungsbanden (und damit die energetische Abfolge der Schwingungsniveaus im elektronischen Grundzustand) [16]. Der Vorteil der separaten Beschreibung wird ersichtlich, wenn die zugrundeliegenden Vorgänge anhand des Verhaltens der Potentialkurven des  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustands betrachtet werden. Jeder der angeführten spektralen Prozesse läßt sich auf diese Weise auf eine elementare Änderung in Lage oder Form der Potentialtöpfe zurückführen.

#### 2.3.2.1 Die Verschiebung der spektralen Lage („S1-Prozeß“)

Die Verschiebung des Fluoreszenzspektrums unter Erhaltung der spektralen Bandenform wird durch eine Änderung des energetischen Abstands von  $S_1$ - und  $S_0$ -Zustand verursacht, bei der weder der relative räumliche Abstand der zugehörigen Potentialminima, noch die Form der Potentialkurven beeinflußt werden (Abbildung 2.6). Strenggenommen gilt die Erhaltung der Bandenform nur für energieproportionale Spektren (üblicherweise Frequenz- und Wellenzahlspektren). Zwei definierte Punkte mit konstantem Abstand  $\Delta\nu$  im Frequenzspektrum (beispielsweise Bandenmaxima), ändern bei einem  $S_1$ -Vorgang mit einer Verschiebung von  $\nu_1, \nu_2$  nach  $\nu_1', \nu_2'$  ihre Wellenlängendifferenz  $\Delta\lambda$  nach  $\Delta\lambda'$  gemäß:

$$\Delta\lambda' - \Delta\lambda = c \cdot \Delta\nu \cdot \left( \frac{1}{\nu_1 \nu_2} - \frac{1}{\nu_1' \nu_2'} \right) \quad (2.4)$$

Bei geringen relativen Verschiebungen  $\Delta\nu/\nu$  ist diese Änderung von  $\Delta\lambda$  jedoch zu vernachlässigen.

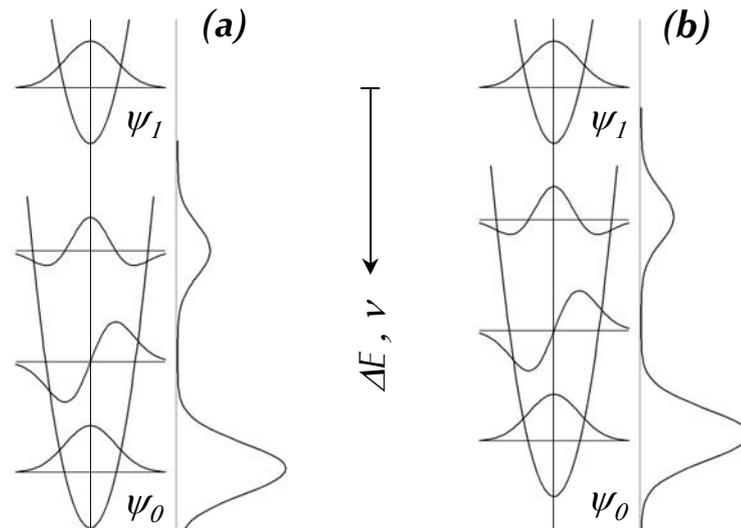


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des S1-Mechanismus für ein zweiatomiges Molekül. Durch die relative Versetzung der Potentiale gegeneinander entlang der Energieachse verschiebt sich das Fluoreszenzspektrum ohne Änderung der Bandenform von (a) nach (b). Der Einfachheit halber wurden die Potentialminima der beiden Zustände derselben Molekülstruktur zugeordnet, daher liegen  $\psi_0$  und  $\psi_1$  in der Darstellung senkrecht untereinander.

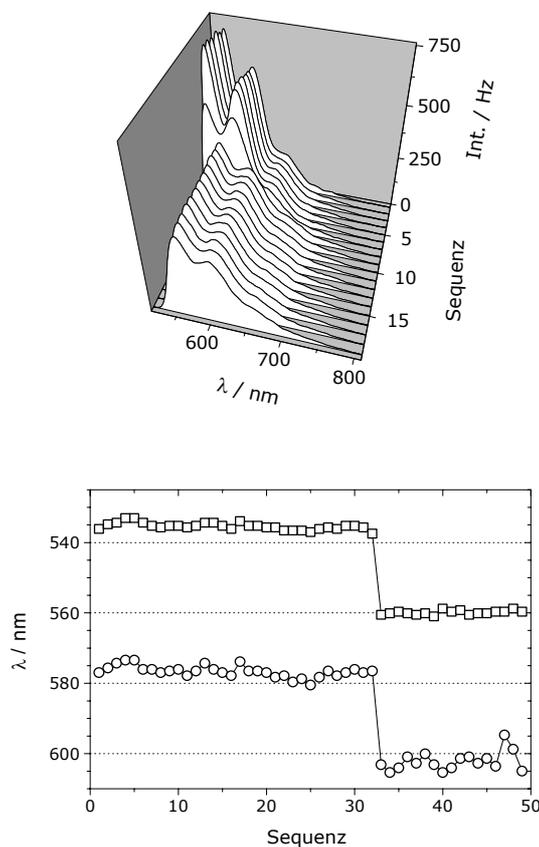


Abbildung 2.7: Beispiel für einen spektralen Sprung, der überwiegend nach dem S1-Mechanismus abläuft. Die Integrationszeit der gezeigten Spektren beträgt 1s. Der Übergang erfolgt während der Aufnahme von Spektrum 7 und bewirkt eine langwellige Verschiebung um  $760\text{cm}^{-1}$ . Die energetischen Abstände in der Schwingungsprogression bleiben während des Sprungs bei  $\sim 1350\text{cm}^{-1}$  nahezu konstant, ebenso das Verhältnis der Bandenintensitäten. Die spektrale Verschiebung ist von einer deutlichen Intensitätsabnahme begleitet [16].

### 2.3.2.2 Die Variation der Franck-Condon-Faktoren („S2-Prozess“)

Die Veränderung der Intensitätsverhältnisse der Schwingungsbanden im Fluoreszenzspektrum wird verursacht durch eine isoenergetische räumliche Verschiebung der Potentialsenken gegeneinander. Die damit einher gehende Änderung der Franck-Condon-Faktoren  $F^2$  spiegelt sich in den Übergangswahrscheinlichkeiten aus dem  $S_1$ -Zustand in die vibronischen Niveaus des elektronischen Grundzustands direkt wider (Abbildung 2.8), da  $F^2$  linear in das Übergangsdipolmoment eingeht.

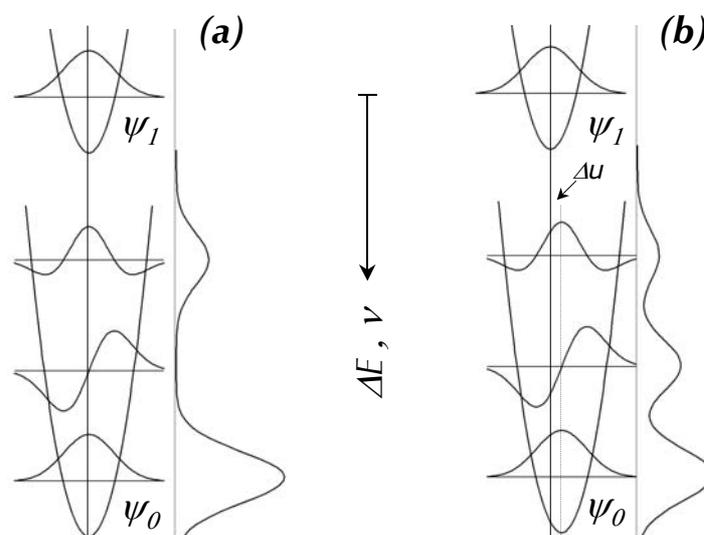


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des S2-Mechanismus. Durch die isoenergetische Versetzung des  $\psi_0$ -Potentials entlang der Vibrationskoordinate ändern sich die Franck-Condon-Faktoren und damit die Übergangswahrscheinlichkeiten von  $\psi_1$  in die jeweiligen Schwingungszustände von  $\psi_0$ .

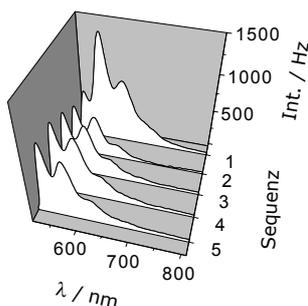


Abbildung 2.9: Beispiel für einen spektralen Sprung, der überwiegend nach dem S2-Mechanismus abläuft. Die Integrationszeit der gezeigten Spektren beträgt 1s. Der Übergang nach Spektrum 2 bewirkt eine relative Verstärkung der  $0 \rightarrow 0$ -Bande gegenüber der  $0 \rightarrow 1$ - und  $0 \rightarrow 2$ -Bande. Die spektralen Lagen der Bandenmaxima bleiben während des Sprungs nahezu konstant bei  $\sim 530$ ,  $\sim 570$  und  $\sim 620$  nm [16]

Zur Veranschaulichung der Abhängigkeit der Intensitätsverhältnisse  $\Phi_{kl} = F_{ak}^2 / F_{al}^2$  von der isoenergetischen Verschiebung  $\Delta u$  soll die Funktion  $\Phi_{kl} = f(\Delta u)$  für ein für ein simples Modellsystem berechnet werden. Dieses sei gegeben durch ein zweiatomiges Molekül mit der reduzierten Masse  $\mu$  und harmonischen Potentialfunktionen identischer Kraftkonstanten  $D$  für die elektronischen Zustände  $\psi_0$  und  $\psi_1$ . Das Potential sei jeweils  $V(x) = (1/2)Dx^2$ . Daraus ergeben sich die drei tiefsten Schwingungswellenfunktionen der Potentiale [22] in normierter Form:

$$\varphi'(u) = \frac{1}{\sqrt[4]{\pi}} \cdot e^{-\frac{u^2}{2}} \quad (2.5)$$

$$\varphi''(u) = \frac{\sqrt{2}}{\sqrt[4]{\pi}} \cdot u \cdot e^{-\frac{u^2}{2}} \quad (2.6)$$

$$\varphi'''(u) = \frac{1}{\sqrt[4]{4\pi}} \cdot (1 - 2u^2) \cdot e^{-\frac{u^2}{2}} \quad (2.7)$$

$$u = (\sqrt[4]{D\mu} / \sqrt{\hbar}) \cdot x \quad (2.8)$$

Die Bandenintensitäten sind proportional zu den Franck-Condon-Faktoren der Übergänge, deren Wurzel ein Maß für die Überlappung der Kernwellenfunktionen der beteiligten Zustände ist. Die Abhängigkeit der  $F_{ak}^2$  von der relativen isoenergetischen Versetzung  $\Delta u$  der Potentialfunktionen wird numerisch ermittelt und graphisch dargestellt.

$$F_{ak}^2(\Delta u) = \left( \int_{-\infty}^{\infty} \varphi_a(u + \Delta u) \cdot \varphi_k(u) du \right)^2 \quad (2.9)$$

In Abbildung 2.10 sind die  $F_{ak}^2$  in Abhängigkeit der isoenergetischen Versetzung  $\Delta u$  dargestellt. Offensichtlich sind bei  $\Delta u = 0$  alle Übergänge  $a \rightarrow k$  verboten, für die nicht  $a = k$  gilt. Für Übergänge aus Zuständen mit gerader Wellenfunktion in solche mit einer Ungeraden ist das leicht zu verstehen, da deren Produkt ungerade ist und das Integral somit verschwindet. Das Verbot der Übergänge zwischen zwei geraden, beziehungsweise ungeraden Quantenzuständen abweichender Schwingungsquantenzahl bei  $\Delta u = 0$  ist eine Folge der angenommenen

Randbedingungen: Identische Potentialfunktionen für  $\psi_0$  und  $\psi_1$  führen zu einem identischen Satz Wellenfunktionen. Verschiedene Wellenfunktionen des gleichen Potentials aber sind zueinander orthogonal, und Integrale über Produkte orthogonaler Funktionen verschwinden. Bereits kleine Unterschiede im Potentialverlauf von  $\psi_0$  und  $\psi_1$  führen zu einer merklichen Übergangswahrscheinlichkeit für die  $0 \rightarrow 2$ -Bande (und der aller anderen zwischen Wellenfunktionen gleicher Symmetrie) bei  $\Delta u = 0$ .

Abbildung 2.11 schließlich zeigt, welche Verhältnisse von Intensitäten der Schwingungsbanden im Fluoreszenzspektrum zu beobachten wären. Die Versetzungseinheit  $u$  wird anschaulich bei der Berechnung der äußeren Wendepunkte der Wellenfunktionen (den Amplituden im klassischen Sinne). Diese befinden sich bei der Nullpunktschwingung genau ein  $u$  von der Ruhelage entfernt (Allgemein gilt  $u_{\max} = (2n+1)^{1/2}$ ;  $n$  ist hier die Schwingungsquantenzahl).

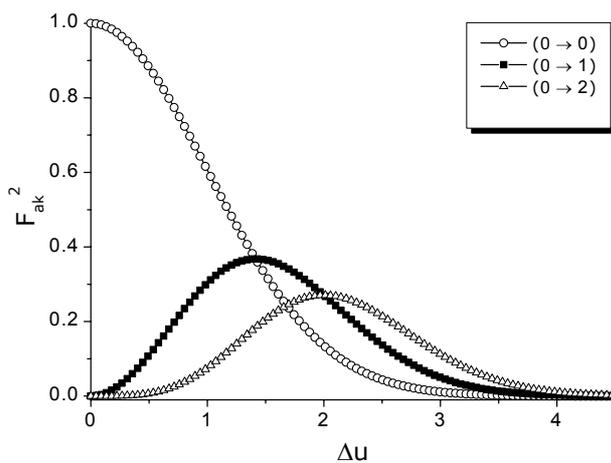


Abbildung 2.10: Franck-Condon-Faktoren der Fluoreszenzübergänge in die niedrigsten drei vibronischen Niveaus des Grundzustands als Funktion der isoenergetischen Versetzung der Potentialfunktionen.

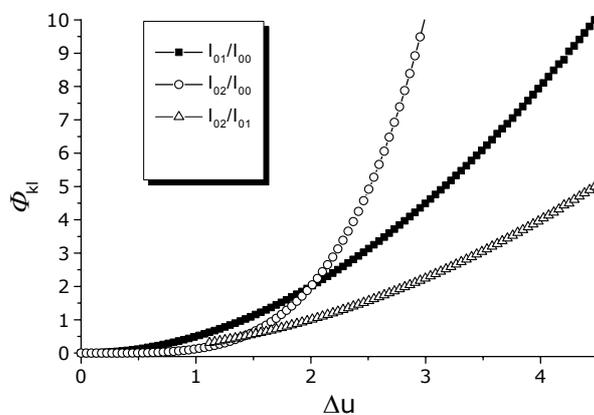


Abbildung 2.11: Die daraus resultierenden Intensitätsverhältnisse der jeweiligen Schwingungsbanden.

### 2.3.2.3 Die Änderung der Spreizung der Schwingungsprogression („S3-Prozeß“)

Die Veränderung der Übergangswellenzahlen zwischen den Schwingungsbanden des Fluoreszenzspektrums wird hervorgerufen durch eine Änderung der Form des Potentialtopfs (Abbildung 2.12). Eine energetische Stauchung bewirkt eine Erhöhung der Schwingungszustandsdichte und somit eine Kumulation der Progression, eine analoge Dehnung bewirkt eine Erniedrigung der Schwingungszustandsdichte und somit eine Spreizung der Progression.

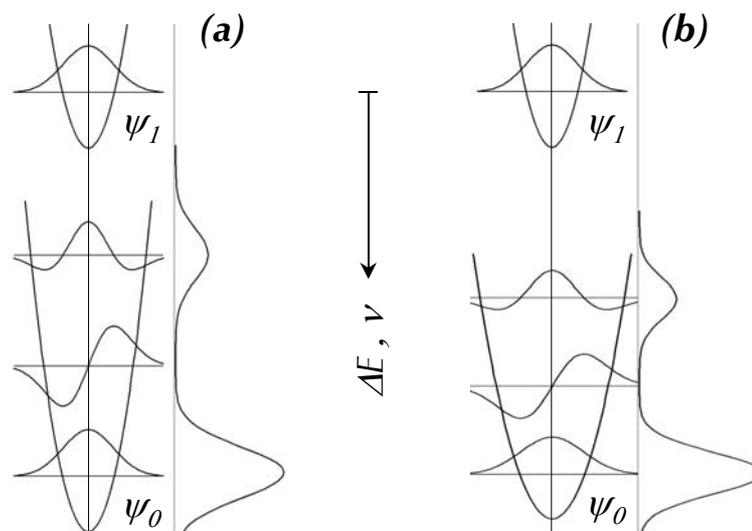


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung des S3-Mechanismus. Durch die Stauchung der Potentialfunktion  $\psi_0$  von (a) nach (b) erhöht sich in diesem Zustand die Dichte der vibronischen Niveaus und die Schwingungsbanden des Fluoreszenzspektrums rücken zusammen. Für diesen Prozeß wurde im Rahmen dieser Arbeit kein signifikantes Beispiel gefunden.

### 2.3.2.4 Variationen in der Auflösung der Progression („S4-Prozeß“)

Ein weiteres spektraldynamisches Phänomen ist die Änderung der Auflösung spektraler Banden. Dabei tritt aus einem vorher unstrukturierten, verschwommenen Spektrum die Schwingungsprogression hervor, beziehungsweise der Vorgang verläuft umgekehrt. Kleine Variationen machen sich in veränderten Bandbreiten der einzelnen vibronischen Banden bemerkbar. Bleibt dabei die Schwingungsstruktur des Spektrums an sich erhalten, so läßt sich dieses Verhalten durch eine Änderung im Ausmaß der spektralen Diffusion mit Zeitkonstanten unterhalb der

Integrationszeit der Spektrenaufnahme erklären (Abbildung 2.13). Erkennbar ist dieses Phänomen beispielsweise in Abbildung 2.7: Die langwellig Verschiebung des Spektrums geht einher mit einer deutlichen Verminderung in der Auflösung der Schwingungsbanden.

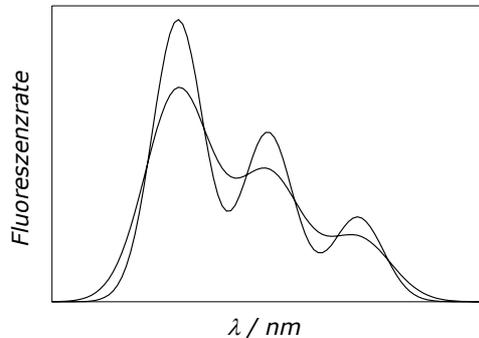


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung eines S4-Prozesses. Alle spektralen Parameter, bis auf die Breiten der Schwingungsbanden, bleiben dabei im Wesentlichen unverändert.

Bei der zeitlichen Verfolgung von Einzelmolekülspektren mit ausreichender Auflösung der Schwingungsprogression lassen sich durch Überlagerung der eingeführten Mechanismen die spektraldynamischen Phänomene beschreiben. Das gilt für Diffusionsvorgänge ebenso wie für Übergangsvorgänge. Erlaubt die Datenlage darüber hinaus eine Überprüfung auf Korrelation der fluktuierenden Beschreibungsparameter, so wird erkennbar, ob deren Fluktuationen gekoppelt sind oder unabhängig voneinander ablaufen.

## 2.4 Der Aufbau des Ensembles

### 2.4.1 Inhomogene Verbreiterung und Reproduzierbarkeit

Die individuellen molekularen Umgebungen der Fluorophore im Festkörper bewirken eine Streuung der Einzelmolekülspektren (und anderer Eigenschaften). Für die daraus resultierende Aufweitung des Ensemblespektrums wurde bereits früh die Bezeichnung „inhomogene Verbreiterung“ eingeführt (1953 für die ESR-Spektroskopie [23], 1969 für die Spektroskopie allgemein [24]). Eine Folge dieser Streuung ist die Unmöglichkeit, von einem Einzelmolekülmeßwert auf das Ergebnis einer vergleichbaren Messung an einem anderen Molekül zu schließen, da die individuellen Umgebungen der einzelnen Fluorophore weder einer direkten Beobachtung, noch einer gezielten Modellierung zugänglich sind. Wegen zeitlicher Fluktuationen in den individuellen Umgebungen ist es darüber hinaus nicht

möglich, die Observablen einer Messung anhand früherer Messungen am selben Molekül vorherzusagen. Ein singuläres Experiment an einem einzelnen Molekül ist also in diesem Sinne nicht reproduzierbar und somit nicht spezifisch für die untersuchte Probe. Die Reproduzierbarkeit des analogen Experiments auf Ensemblesniveau erklärt sich durch dessen immanente Mittelung über alle Einzelmolekülbeiträge. Um also reproduzierbare und spezifische Aussagen aus Einzelmoleküluntersuchungen treffen zu können, bietet sich also an, eine repräsentative Menge von Einzelmolekülmessungen statistisch auszuwerten. Dabei führt die Mittelung von Größen mit arithmetischer Korrespondenz nach Gleichung 2.1 offensichtlich zum Ensemblewert und ist damit geeignet, zur Überprüfung der Repräsentativität der Datensammlung zu dienen. Wirklich neue Einblicke in das Verhalten des Farbstoff/Matrix-Systems erhält man bei der statistischen Auswertung der Meßgrößen ohne diese arithmetische Korrespondenz mit dem Ensemble. Hier werden Verteilungsfunktionen, beziehungsweise deren Mittelwerte gewonnen, die im Ensembleexperiment nicht zugänglich sind. Beispiele hierfür sind die in Abbildung 2.1 dargestellten Verteilungsfunktionen.

#### 2.4.2 Subensemble

Besteht ein Ensemble aus Teilchen, die sich anhand spezifischer Kriterien in Gruppen unterteilen lassen, so sollen diese als *Subensemble* bezeichnet werden. Da die Teilchen dieser Subensemble nur Erscheinungsformen, sogenannte *Phänotypen*, eines chemisch homogenen Farbstoffs sind, ist davon auszugehen, daß auch in fester Matrix ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den Phänotypen herrscht. Die den Subensemble zugeordneten Spezies sind also nicht isolierbar und daher im Ensemble auch nicht isoliert zu untersuchen. Die Unterschiede im Verhalten der Phänotypen können auf Isomeren der Konformation (z.B. bei Rotameren), der Konfiguration (z.B. bei cis/trans-Gleichgewichten) oder der Konstitution (z.B. bei Tautomeren) beruhen. Auf Einzelmolekülniveau jedoch sind die Eigenschaften der jeweiligen Spezies zugänglich, wenn die Zeitkonstante der Umwandlung zwischen den Phänotypen größer ist als die Integrationszeit der Messung. Die Meßwerte dieser Einzelmolekülexperimente lassen sich dann für jedes Subensemble separat mitteln (beziehungsweise zu Verteilungsfunktionen auftragen). Auf diese Weise sind

spezifische Erkenntnisse über die einzelnen Phänotypen gewinnbar, die dem Ensembleexperimente vorenthalten sind. Die Mittelwerte der  $M$  einzelnen Subensemble setzen sich bei korrekter Gewichtung zum Ensemblewert zusammen:

$$Q = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M c_m Q_m \quad (2.10)$$

In die Gewichtungsfaktoren  $c_m$  gehen einerseits photophysikalische Faktoren ein, die Einfluß auf die Größe  $Q$  haben, wie beispielsweise subensemble-spezifische Absorptionsquerschnitte und Fluoreszenzquanteneffizienzen. In erster Linie jedoch wird  $c_m$  durch den Molenbruch des jeweiligen Phänotyps im Ensemble bedingt.

Ist der Satz der zur Untersuchung ausgewählten Moleküle nicht repräsentativ für das Ensemble, können einzelne Subensemble zu stark gewichtet werden. Mittelungen von Einzelmolekülgrößen nach Gleichung 2.1 weichen dann vom Ensemblewert ab. Dieser Fall tritt leicht, wenn sich ein Phänotyp in der Probe des Einzelmolekülexperiments bevorzugt auffinden läßt, beispielsweise durch eine höhere Fluoreszenzrate oder Photostabilität.

## 2.5 Methoden zur statistischen Auswertung

### 2.5.1 Verteilungsfunktionen

Verteilungsfunktionen  $\mathcal{N}(q)$  geben die Häufigkeit an, mit der ein Meßwert im Wertebereich von  $q$  bis  $q+\Delta q$  aufgetreten ist. Sie lassen sich durch Betrachtung im Histogramm qualitativ interpretieren, oder, wenn das beobachtete Verhalten bereits theoretisch beschrieben ist, durch Fitfunktionen quantitativ auswerten. Welche Erkenntnisse sich aus der Verteilungsfunktion gewinnen lassen, ist durch die Zusammensetzung des zu analysierenden Datensatzes bedingt. Ist die Quelle der Daten ein einziges Molekül, spiegelt sich die Dynamik dieses Moleküls in der Verteilungsfunktion  $\mathcal{N}(q_t)_n$  wider (Abbildung 2.13, a). Akkumulationen in dieser lassen auf eine übergangsartige Dynamik schließen (Abbildung 2.2). Stammen die Daten gleichgewichtet von den verschiedenen Molekülen eines repräsentativen Querschnitts des Ensembles, stellt die Verteilungsfunktion  $\mathcal{N}(q_n)_t$  die Verteilung der Meßgröße im Ensemble dar (Abbildung 2.13, b). Akkumulationen in einem solchen

Histogramm sind ein Zeichen für das Auftreten von Subensembeln. Weiterhin kann die Gesamtzahl der bis zur Photozerstörung aufgenommenen Meßwerte aller Moleküle aufgetragen werden ( $\mathcal{N}(q_n, t)$  Abbildung 2.13, c), sowie die Mittel über alle Meßwerte bis zur Photozerstörung für jedes Molekül ( $\mathcal{N}(\langle q \rangle_n)$ , d). Die verschiedenen Zusammensetzungen der Datensätze von Verteilungsfunktionen ist in Abbildung 2.13 veranschaulicht.

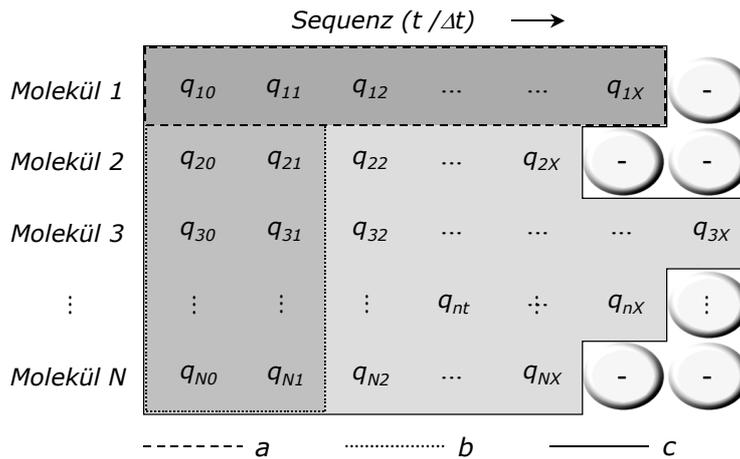


Abbildung 2.13: Schema der Datenzusammenstellung. Der erste Index ( $n$ ) bezieht sich auf das Molekül, der Zweite ( $t$ ) auf die Sequenz. Diese läuft bis zur Photozerstörung des Molekül nach der Zeit  $X_n \times \Delta t$ .

Die verschiedenen Verteilungsfunktionen sollen nun noch formal definiert werden:

$$(a) \quad \mathcal{N}(q_t)_n : q \mapsto \mathcal{N}[q(t)]_n \quad (2.11)$$

$$(b) \quad \mathcal{N}(q_n)_{[t_0, t_1]} : q \mapsto \sum_{t=t_0}^{t_1} \mathcal{N}[q(n)]_t \quad (2.12)$$

für den Sonderfall, daß von jedem Molekül nur ein Meßwert einfließt:

$$\mathcal{N}(q_n)_t : q \mapsto \mathcal{N}[q(n)]_t \quad (2.13)$$

$$(c) \quad \mathcal{N}(q_{n,t}) : q \mapsto \mathcal{N}[q(n,t)]_{n,t}^{N, X_n} \quad (2.14)$$

$$(d) \quad \mathcal{N}(\langle q \rangle_n) : q \mapsto \mathcal{N}\left[\frac{1}{X} \sum_{t=0}^{X_n} q(n)_t\right] = \mathcal{N}[\langle q(n) \rangle] \quad (2.15)$$

Sind die zeitlichen Verteilungen der Einzelmoleküle  $\mathcal{N}(q_t)_n$  für  $X_n \rightarrow \infty$  identisch mit der Verteilungsfunktion des Ensembles  $\mathcal{N}(q_n)_t$  für  $N \rightarrow \infty$  (und demnach auch mit  $\mathcal{N}(q_n, t)$ ), so wird das Verhalten der untersuchten Moleküle *ergodisch* genannt. Im realen Experiment ist weder  $N \rightarrow \infty$ , noch  $X_n \rightarrow \infty$  annähernd zu erfüllen. Insbesondere die Anzahl der Messungen pro Molekül  $\Delta t/t$  ist durch die photochemische Lebensdauer des jeweiligen Moleküls sehr begrenzt. Daher weichen die Verteilungsfunktionen der einzelnen Moleküle voneinander und von der Verteilungsfunktion des Ensembles ab. Das hat jedoch den Vorteil, daß bei vielen Molekülen einzelne dynamische Vorgänge sehr deutlich hervortreten, da sie kaum durch andere Prozesse überlagert sind.

Zeigt sich, daß ein bestimmter Übergang in Ausmaß und Erscheinungsform identisch bei vielen individuellen Molekülen auftritt, so ist dieser Prozeß für den Farbstoff spezifisch, da die Umgebungseigenschaften in amorpher Matrix statistisch variieren. Ein solcher spezifischer Übergang ist prinzipiell auch an einem isolierten Farbstoffmolekül denkbar. Da diese Phänomene also aus Änderungen im Zustand des Farbstoffmoleküls selbst resultieren, sollen sie als *intrinsisch* bezeichnet werden. Typische Beispiele intrinsischer Vorgänge sind „Intersystem Crossing“, Konformationswechsel und Tautomerien. Aus der Existenz von intrinsischen, farbstoffspezifischen Übergangsprozessen folgt zwangsläufig der Zerfall des Ensembles in Subensemble. Zwischen den Phänotypen dieser Subensemble erfolgen die Sprünge der molekularen Fluoreszenzparameter. In der Verteilungsfunktion über eine große Zahl von Molekülen können diese Subensemble durch inhomogene Verbreiterung verborgen sein (Abbildung 2.14).

Im Gegensatz zu intrinsischen Prozessen haben *Extrinsische* ihren Ursprung in der wechselwirkenden Umgebung des Fluorophores. Extrinsische Prozesse sind also am isolierten Farbstoffmolekül nicht denkbar. Dabei können sich diese Umgebungsvorgänge sowohl diffusionsartig, als auch übergangsartig äußern (Strenggenommen sind auch Diffusionsprozesse nur eine zufällige Abfolge einer Vielzahl nicht aufgelöster Übergänge in der molekularen Umgebung). Typische Beispiele extrinsischer Prozesse, die eine Änderung im Fluoreszenzverhalten eines Farbstoffmoleküls bewirken, sind die Dynamik der Matrixmoleküle, Diffusionsvorgänge und Veränderungen äußerer Felder. Unter dem Begriff Polymerdynamik sind hier die Neuaneordnungen von Polymerketten zueinander, und die der einzelnen Monomere und Gruppen einer Kette zusammengefaßt.

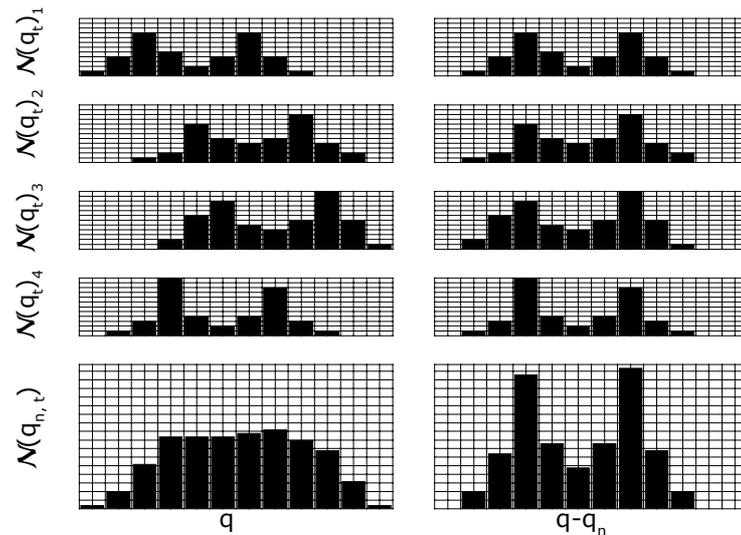


Abbildung 2.14: Linke Spalte: Verteilungsfunktionen des spektralen Parameters  $q$  über vier hypothetische Moleküle mit intrinsischem Übergang und deren inhomogen verbreiterte Summe. Rechte Spalte: Die gleichen Verteilungen, um ihre individuelle Verschiebung  $q_n$  korrigiert, sowie die dazugehörige Summenfunktion, in der sich nun die bimodale Verteilung der eingehenden Histogramme widerspiegelt.

Die Diffusionsvorgänge beinhalten alle Wechselwirkungen des Fluorophores mit den in der Matrix gelösten, beweglichen Verunreinigungen, einschließlich der atmosphärischen Gase. Die Veränderung äußerer Felder stellt einen Sonderfall dar, da sie experimentell (zumindest makroskopisch) kontrollierbar sind. Ein bekanntes Beispiel dafür ist der Stark-Effekt.

Anders als Intrinsische, sind extrinsische Sprungvorgänge individuelle Phänomene des einzelnen Moleküls, die sich bei anderen Molekülen des Ensembles nicht (oder höchstens zufällig) wiederholen. Extrinsische Übergänge teilen daher das Ensemble auch nicht in Subensemble, sondern tragen nur zu dessen inhomogener Verbreiterung bei. (Anders liegt der Fall in kristalliner Matrix. Die dort vorherrschende Fernordnung ermöglicht im gesamten Ensemble regelmäßig wiederkehrende extrinsische Übergangsmechanismen, die hier eine Bildung von Subensembeln bewirken können [25].)

Molekulardynamisch unterscheiden sich intrinsische und extrinsische Vorgänge durch das Verhalten der Potentialhyperflächen des Farbstoffmoleküls. Ein rein intrinsischer Prozeß ist ein Übergang zwischen Potentialminima des isolierten Moleküls ohne Verformung seiner Hyperfläche. Ein rein extrinsischer Prozeß ist die

Verschiebung von Minima der Hyperfläche durch äußere Einflüsse. Dabei durchläuft das Farbstoffmolekül keinen Übergangszustand. Diese Kriterien sind in Abbildung 2.16 und Abbildung 2.17 schematisch veranschaulicht.

Schwierigkeiten bereitet die Zuordnung in Fällen, bei denen eine Änderung der Umgebungsparameter (Verformung der Hyperfläche) einen Übergang zwischen spezifischen Zuständen des Farbstoffmoleküls (Minima der Hyperfläche) auslöst oder erst ermöglicht.

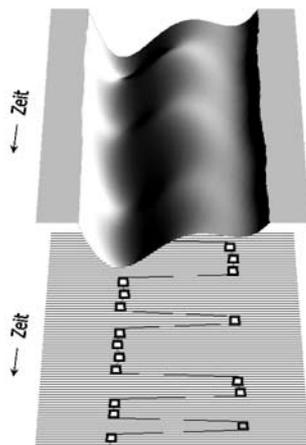


Abbildung 2.16: Zeitliche Entwicklung einer zweidimensionalen Potentialkurve mit zwei Minima, zwischen denen intrinsische Übergänge auftreten. Die Form der Potentialkurve bleibt dabei im Wesentlichen unverändert. Diffusionsartige Dynamik ist mit intrinsischen Vorgängen allein nicht zu erklären.

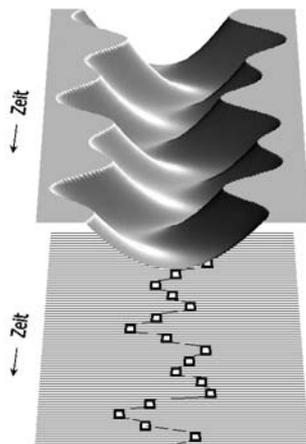


Abbildung 2.17: Zeitliche Entwicklung einer zweidimensionalen Potentialkurve, die stark von der Umgebungsdynamik beeinflusst wird. Der Fluorophor und seine Eigenschaften folgen den Änderungen der Potentialkurve. Hier dargestellt ist eine diffusionsartige extrinsische Dynamik. Bei sprunghaften Änderungen zwischen wiederkehrenden Formen des Potentials tritt dagegen übergangsartige Dynamik mit extrinsischem Ursprung auf.

### 2.5.2 Korrelation von Fluoreszenzeigenschaften

Um signifikante Zusammenhänge zwischen zwei (oder mehreren) veränderlichen Meßgrößen nachzuweisen, werden diese gegeneinander aufgetragen. Für den Fall unkorrelierter Größen ordnen sich die Datenpaare statistisch um eine Achsparallele oder symmetrisch um einen Punkt (Bei der Auftragung der Abweichungen der Meßwerte von ihrem Mittelwert ordnen sich die Datenpaare um die Achsen und den Ursprung selbst an). Alle anderen Anordnungen einer statistisch relevanten Menge von Datenpaaren deuten auf korrelierende Eigenschaften hin. Existiert eine theoretische Beschreibung des beobachteten Zusammenhangs, sind durch Anpassung von Fitfunktionen quantitative Erkenntnisse zugänglich. Das Ausmaß des Zusammenhangs wird dabei durch den Korrelationskoeffizienten ausgedrückt. Der einfachste Fall einer auswertbaren Korrelation ist die lineare Abhängigkeit.

Zwei Eigenschaften können auch eine zeitlich verzögerte Korrelation aufweisen. Eine Änderung der einen Größe  $q'_n(t)$  führt dann nach der mittleren Zeit  $\tau$  zu der zugeordneten Änderung in der anderen Größe  $q''_n(t)$ . Zur Beschreibung dieses Verhaltens dient die Kreuzkorrelationsfunktion (Die Division durch  $G = g^x(0)$  normiert die Funktion):

$$g^x(\tau) = \frac{1}{G} \int_0^{\infty} q'_n(t) \cdot q''_n(t + \tau) dt \quad (2.16)$$

Zur Untersuchung wiederholt auftretender Prozesse läßt sich die Korrelation einer veränderlichen Größen mit sich selbst nach der Verzögerung  $\tau$  bestimmen. Dann wird aus der Kreuz- die Autokorrelationsfunktion:

$$g^*(\tau) = \frac{1}{G} \int_0^{\infty} q'_n(t) \cdot q'_n(t + \tau) dt \quad (2.17)$$

Sind die Mechanismen der untersuchten Dynamik bekannt, so lassen sich oft anhand theoretischer Modelle berechnete Autokorrelationsfunktionen an die experimentell gewonnenen anfitzen. So lassen sich Prozeßgrößen im Sinne von Abschnitt 2.2 quantitativ ermitteln. Ohne zugrundeliegende Theorie ist eine

Korrelationsfunktion nicht quantitativ auswertbar. Oft geben sie jedoch Hinweise auf die zugrunde liegenden physikalischen Zusammenhänge.

Es ist auch in diesem Zusammenhang von Bedeutung, ob Meßgrößen nur eines Moleküls miteinander korrelieren, oder ob die Korrelation viele, oder sogar alle untersuchten Moleküle betrifft. Gilt ein Zusammenhang für eine Vielzahl von Molekülen, so äußert sich dies in ähnlichen Parametern der zur Auswertung angewandten Fitfunktion. Sollen Meßgrößen mehrerer Moleküle in einem Diagramm dargestellt werden, erfordert das eine der Meßgröße angepaßte Normierung.

### 2.5.3 Koinzidenzen von Einzelmolekülphänomenen

#### 2.5.3.1 Zeitliche Häufung bei einem Molekül

Ist nur die zeitliche Verteilung von Sprungprozessen, nicht aber deren Vorzeichen oder Betrag von Interesse, können aus Korrelationsfunktionen keine Erkenntnisse gewonnen werden. Ob das Auftreten eines Prozesses die Wahrscheinlichkeit für das nochmalige Auftreten des selben Prozesses beeinflusst, läßt sich an der Häufigkeitsverteilung  $P(k)$  der Ereignisse pro Zeitraum  $x \times \Delta t$  erkennen. Diese sollte für nicht zu große mittlere Häufigkeit  $x \times p$  der Poisson-Statistik folgen, wenn der untersuchte Prozeß unabhängig abläuft, und damit die Ereignisse zeitlich zufallsverteilt sind ( $p$ : A priori Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Phänomens pro Zeitinkrement  $\Delta t$ ). Abweichende Verteilungsformen weisen auf zeitliche Kumulation, beziehungsweise Repulsion hin (Abbildung 2.18). Jede mögliche Verteilung erfüllt dabei die Randbedingungen  $\sum P(k)=1$  und  $\sum k \times P(k)=x \times p$ . Eine zeitliche Kumulation der Ereignisse führt zu einer verringerten relativen Häufigkeit von durchschnittlichen Ereigniszahlen  $P(k=x \times p)$  zugunsten der Häufigkeiten sehr geringer und sehr hoher Ereigniszahlen,  $P(k < x \times p)$  und  $P(k > x \times p)$ . Insbesondere  $P(k=0)$  kann stark zunehmen. Eine zeitliche Repulsion der Ereignisse erhöht die relative Häufigkeit der durchschnittlichen Ereigniszahlen  $P(k=x \times p)$ . Je stärker die zeitliche Gleichverteilung der Ereignisse ist, desto schärfer ist die Verteilungsfunktion um  $k=x \times p$  angeordnet (Abbildung 2.18).

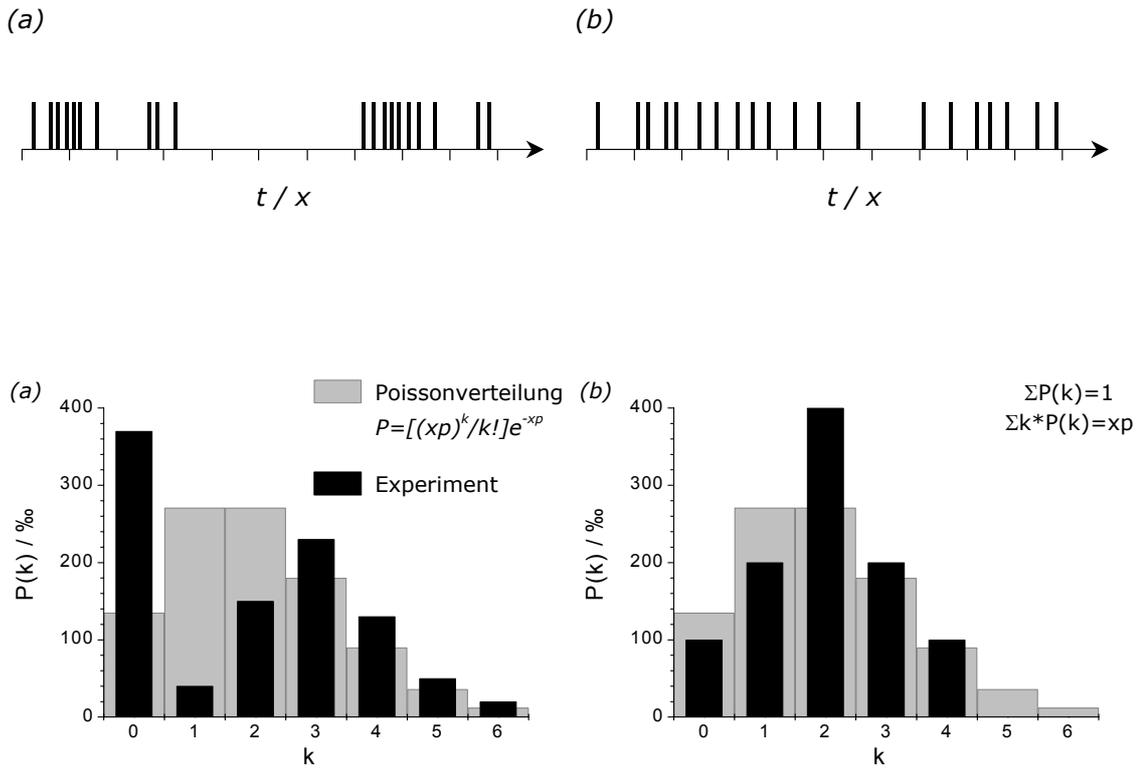


Abbildung 2.18: (a) Hypothetische zeitliche Verteilung eines kumuliert auftretenden Phänomens und die entsprechende Häufigkeitsverteilung für  $k$ -faches Auftreten im Zeitinkrement  $x$ . Der Wert für  $k = 0$  und die für  $k > x \times p$  steigen gegenüber der Poissonverteilung signifikant an (Im gezeigten Beispiel ist  $x \times p = 10 \times 0.2 = 2$ ). (b) Hypothetische zeitliche Verteilung eines repulsiv auftretenden Phänomens und die entsprechende Häufigkeitsverteilung. Die zunehmende zeitliche Gleichverteilung des Phänomens führt zu einer schärferen Verteilungsfunktion um den Wert  $k = x \times p$ .

Der Einfluß eines Phänomens auf die Auftrittswahrscheinlichkeit eines anderen läßt sich an der Häufigkeit erkennen, mit der beide Phänomene in einem Beobachtungszeitraum der Länge  $x \times \Delta t$  gemeinsam auftreten. Die Wahrscheinlichkeit, daß von beiden Phänomen jeweils mindestens ein Ereignis auftritt, ist für zwei zufallsverteilte Prozesse:

$$\begin{aligned}
 P_{1,2} &= P_1(k > 0) \times P_2(k > 0) = [1 - (1 - p_1)^x] \times [1 - (1 - p_2)^x] \\
 &\approx [1 - \exp(-xp_1)] \times [1 - \exp(-xp_2)]
 \end{aligned}
 \tag{2.18}$$

Ein Vergleich des berechneten Werts  $P_{1,2}$  mit dem experimentell Ermittelten  $O_{1,2}$  erlaubt Rückschlüsse auf Wechselwirkungen der Phänomene untereinander. Ist der Quotient  $O_{1,2}/P_{1,2}$  kleiner als 1, so deutet das auf eine gegenseitige Behinderung der beiden Phänomene hin, die zu deren zeitlichen Repulsion führen. Ist der Quotient  $O_{1,2}/P_{1,2}$  größer als 1, so ist das ein Zeichen für gegenseitige Begünstigung der Phänomene, die zu deren zeitlichen Kumulation führen.

Alle diese Betrachtungen lassen sich nur auf abzählbare Ereignisse anwenden, also auf deutlich erkennbare Sprünge von Fluoreszenzparametern einzelner Moleküle. Die zu untersuchende spektrale Sequenz dieser Moleküle muß ausreichend lang sein, um eine statistisch relevante Anzahl von Zeitabschnitten  $x$  zu ermöglichen.

### 2.5.3.2 Häufungen spektraler Phänomene an einzelnen Molekülen

Diese Art der Betrachtung zeigt, ob ein dynamisches Phänomen bevorzugt bei Molekülen beobachtet werden kann, die bereits ein anderes Phänomen aufweisen. Dazu werden die Anteile der Moleküle ermittelt, die die jeweiligen Prozesse zeigen, beziehungsweise deren Koinzidenz. Da hier Moleküle und nicht Ereignisse gezählt werden, können in diesem Fall auch Diffusionsvorgänge betrachtet werden. Der Anteil der Moleküle, die ein bestimmtes Phänomen aufweisen, stellt dessen relative Wahrscheinlichkeit pro Molekül  $p'_i$  dar. Die Wahrscheinlichkeit einer Koinzidenz zweier voneinander unabhängiger Prozesse bei einem Molekül  $P'_{1,2}$  ist dann:

$$P'_{1,2} = p'_1 \times p'_2 \quad (2.19)$$

Liegt die experimentell ermittelte Anzahl an Koinzidenzen zweier Phänomene signifikant über dem berechneten Wert, scheinen die untersuchten Prozesse unter den gleichen molekularen Bedingungen bevorzugt aufzutreten. Liegt der experimentelle Wert deutlich unter dem Berechneten, deutet das darauf hin, daß die molekularen Bedingungen, die die jeweiligen Prozesse begünstigen, sich stark unterscheiden.

### 3 Experimenteller Teil

Um Eigenschaften und Prozesse, die an einzelnen Farbstoffmolekülen beobachtbar sind, ohne genaue Kenntnis von deren molekularer Umgebung zu deuten, ist es erforderlich, zumindest das makroskopische Verhalten dieses Farbstoffs unter möglichst vergleichbaren Bedingungen bezüglich der Matrixparameter zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenz des N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylen-3,4-dicarboximid (**PI**) und seiner Derivate 9-Amino-PI (**API**), N,N-di(*tert*-butoxycarbonyl)-API (**DAPI**) und 1,6,9-Tribrom-PI (**PIBr<sub>3</sub>**) auf Einzelmolekülebene untersucht und mit den jeweiligen spektralen Eigenschaften im Ensemble in Beziehung gesetzt. Alle verwendeten Farbstoffe wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Müllen am Max Planck Institut für Polymerforschung in Mainz entwickelt und synthetisiert [26].

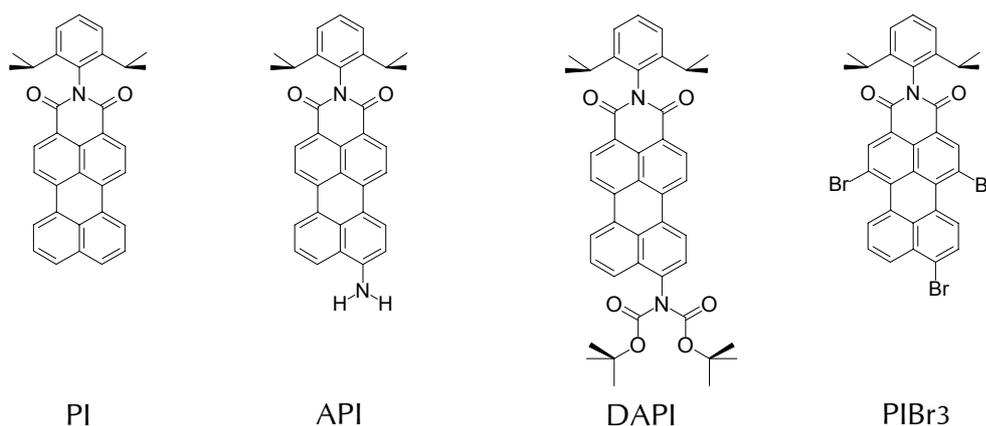


Abbildung 3.1: Die Strukturen der untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe.

In den Einzelmolekülexperimenten wurden die Farbstoffe zur Immobilisierung stark verdünnt in eine Polystyrolmatrix eingebettet. Ataktisches Polystyrol ist hochamorph und läßt eine statistische Verteilung der Einzelmoleküleigenschaften erwarten, sofern diese nur durch die Umgebung beeinflusst werden.

Die Präparation klarer, planparalleler Polystyrolschichten mit hohem Farbstoffgehalt (wegen Aggregation) und ausreichender, reproduzierbarer Dicke für die Ensemblemessungen erwies sich aus verschiedenen Gründen als sehr problematisch. Aus diesem Grund wurden die Ensembleexperimente überwiegend in der flüssigen Phase durchgeführt. Dabei wurde zumeist Toluol als Lösungsmittel

verwendet, dessen physikalische und chemische Parameter, bis auf die mit der Viskosität zusammenhängenden Größen, denen des Polystyrols recht nahekommen.

Eigenschaften bei Standardbedingungen	Polystyrol	Toluol
Molare Masse (M)	<sup>a</sup> $\varnothing$ 250000 g/mol	<sup>a</sup> 92,15 g/mol
Dichte ( $\rho$ )	<sup>a</sup> 1,050 g/cm <sup>3</sup>	<sup>a</sup> 0,8631 g/cm <sup>3</sup>
Schmelzpunkt ( $T_m$ )	<sup>a</sup> 237°C	<sup>a</sup> -95°C
Brechungsindex ( $n_D^{20}$ )	<sup>a</sup> 1,5916	<sup>a</sup> 1,4969
Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ )	<sup>b</sup> 2,5	<sup>c</sup> 2,379
O <sub>2</sub> -Aufnahmekapazität ( $k_{\text{Henry}}$ )	<sup>e</sup> $2,2 \times 10^{-3}$ mol/(l bar)	<sup>d</sup> $4,8 \times 10^{-3}$ mol/(l bar)
Wärmeleitfähigkeit ( $\Lambda$ )	<sup>d</sup> 0,16 W/(Km)	<sup>d</sup> 0,1438 W/(Km)
Dipolmoment ( $\mu$ )	<sup>f</sup> 0,2-0,3 Debye (pro Einheit)	<sup>d</sup> 0,37 Debye
Absorptionsmaximum ( $\lambda$ )	<sup>g</sup> 259,6 / 269,2nm	<sup>g</sup> 262,2 / 269,2nm

*Tabelle 3-1: Einige physikalische Parameter von Polystyrol und Toluol im Vergleich (a: [27], b: [28], c: [29], d: [30], e: [31], f: [32], g: Messung in 1,2-Dichlorethan, der erste Wert bezeichnet das absolute Maximum, der zweite die längstwellige Bande).*

Experimente, die zur Beurteilung der Übertragbarkeit von Erkenntnissen von der einen zur anderen Matrix durchgeführt wurden, sind in Kapitel 4 beschrieben.

### **3.1 Ensemblemessungen**

Die Messung der Extinktionsspektren wurde an einem Spektralphotometer des Typs Varian Cary 50 Bio durchgeführt, die der Fluoreszenzspektren an einem Varian Cary Eclipse, außer den Experimenten in den Abschnitten 4.4 und 4.5. Hier wurde ein Perkin Elmer Lambda 19 für die Extinktionsmessung, sowie ein Spex Fluorolog 2 für die Fluoreszenzmessungen verwendet. Eine Korrektur der instrumentellen Einflüsse wie Lampenspektrum und Detektorcharakteristik auf die Fluoreszenzspektren war bei den durchgeführten Experimenten nicht erforderlich. Daher sind die Fluoreszenzspektren wie gemessen abgebildet.

Eine hervorragendes Verfahren zur Bandenanalyse selbst verschwommener Spektren ist die Derivativspektroskopie [33]. Die hier angewandte Methode beruht auf der nachträglichen zweifachen Ableitung der aufgenommenen Extinktionsspektren. Da sich das Signal/Rausch-Verhältnis bei jeder Differentiation

signifikant verschlechtert, muß bereits das Ausgangsspektrum möglichst rauscharm sein und das Derivativspektrum entsprechend geglättet werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Ableitungen beruhen auf Extinktionsspektren, bestehend aus 3500 Datenpunkten mit jeweils 0,2s Integrationszeit, mit nachfolgender fließender Glättung über 100 Datenpunkte, respektive 10nm.

Während bei der zweifachen Differentiation de facto Information in Form konstanter Hintergründe und Steigungen verloren geht, tritt die Bandenstruktur eines Spektrums um so deutlicher hervor. Der Verlust der konstanten Anteile erweist sich bei Messungen diffuser oder nicht planparalleler Proben sogar als Vorteil, beispielsweise beim Vergleich zwischen Spektren in Polystyrol und Toluol. In der quantitativen Analyse von Gemischen (von beispielsweise Subensembeln) zeigt sich die Derivativspektroskopie ebenfalls überlegen. Die Ableitung n-ter Ordnung bleibt eine lineare Funktion der Konzentration:

$$(\partial^n E / \partial \lambda^n) = d \cdot c \cdot (\partial^n \varepsilon / \partial \lambda^n) \quad (3.1)$$

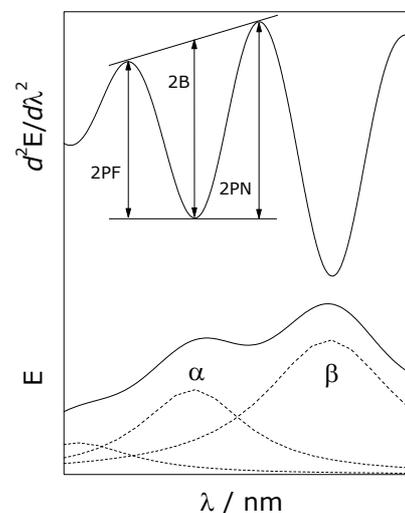
Verschiedene, Methoden die Ableitungen von Spektren zur Quantifizierung von Konzentrationen auszumessen, wurden von O'Haver und Green gegenübergestellt und auf ihre systematischen Fehler untersucht [34]. Drei Verfahren sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

Abbildung 3.2: Ein aus drei Schwingungsbanden zusammengesetztes Extinktionsspektrum und das dazu gehörige Derivativspektrum zweiter Ordnung. Drei graphische Verfahren zur quantitativen Analyse von Bande  $\alpha$  neben der überlagerten Bande  $\beta$  sind dargestellt:

**2B:** „2. Ableitung, Baseline“,

**2PN:** „2. Ableitung, Next Peak“,

**2PF:** „2. Ableitung, Far Peak“ [34].



## 3.2 Einzelmolekülexperimente

Das hier eingesetzte Verfahren, individuelle Moleküleigenschaften zu untersuchen beruht auf dem Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie: Monochromatisches Anregungslicht wird mit einem Mikroskopobjektiv beugungsbegrenzt auf die Probe fokussiert. Die im Fokus erzeugte Lumineszenz wird durch das selbe Objektiv gesammelt, durch einen Bandfilter vom Anregungslicht befreit und detektiert. Der Bildaufbau erfolgt durch Rastern der Probe. Das Resultat ist ein Fluoreszenzbild mit beugungsbegrenzter Auflösung. Enthält eine ansonsten fluoreszenzfreie Probe einen fluoreszierenden Farbstoff in so geringer Konzentration, dass die einzelnen Moleküle lateral im Mittel weiter auseinander liegen als die Beugungsgrenze misst, lässt sich die Fluoreszenz einzelner Farbstoffmoleküle separat aufnehmen und analysieren.

### 3.2.1 Das konfokale Mikroskop

Der konfokale Aufbau basiert auf dem Gehäuse und der Optik eines Zeiss Axiovert 135 TV. Es wurden zwei, leicht voneinander abweichende experimentelle Anordnungen eingesetzt. In den ersten Meßreihen wurde die 514,5nm Linie eines Argonionenlasers zur Anregung benutzt. Das Anregungslicht wurde dabei über mehrere Spiegel und eine strahlaufweitende Linsenordnung in das Mikroskop gelenkt (Diese Methode wird im Folgenden als Direkteinkopplung bezeichnet. Zur Anordnung siehe Abbildung 3.3). Als Strahlteiler diente dabei ein dichroitischer Spiegel der Halbwertswellenlänge 514nm (Farbteiler Zeiss FT510). Es zeigte sich, daß durch die flache Transmissionskurve des Farbteilers der überwiegende Teil der aufgenommenen Spektren kurzwellig abgeschnitten ist. Aus diesem Grund wurde bei den späteren Meßreihen die 488nm Linie des Argonionenlasers zur Anregung, und eine planparallele Glasplatte als Strahlteiler benutzt. Desweiteren wurde das Anregungslicht bei dieser Anordnung über eine Glasfaser zum Mikroskop geleitet (Diese Methode wird im Folgenden als Fasereinkopplung bezeichnet. Zur Anordnung siehe Abbildung 3.4). Eine Kombination aus einem Polarisationsfilter, einer  $\lambda/4$ - und einer  $\lambda/2$ -Platte unter den geeigneten Drehwinkeln führen zu zirkularer Polarisation des Anregungslichts im Fokus. Damit wird der

Absorptionsquerschnitt der Moleküle in der Probe unabhängig von ihrer lateralen Orientierung.

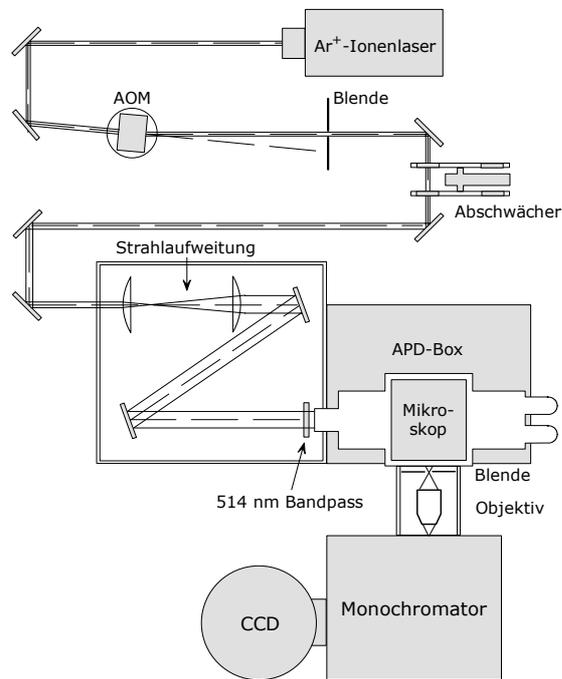


Abbildung 3.3: Experimentelle Anordnung zur Direkteinkopplung,  $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$ .

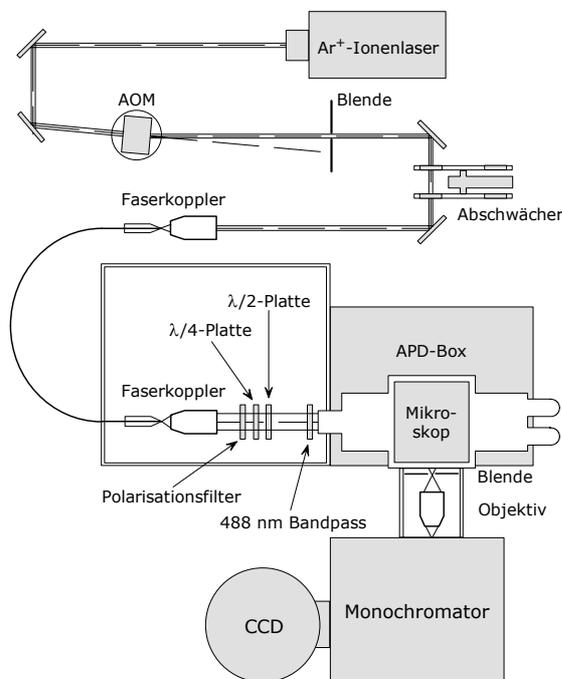


Abbildung 3.4: Experimentelle Anordnung zur Fasereinkopplung,  $\lambda_{\text{EX}} = 488\text{nm}$ .

Gemeinsam ist beiden Anordnungen die eigentliche konfokale Optik. Das Anregungslicht tritt als paralleler Strahl durch einen Bandpassfilter (LOT-Oriel GmbH, FWHM  $\approx 0,7\% \lambda_{\text{Max}}$ ) der jeweiligen Wellenlänge in das Mikroskop. Dort lenkt der Strahlteiler einen Teil des Lichts in das Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 100 $\times$ /1.3 Oil). Dieses fokussiert das Anregungslicht auf die Probe und sammelt gleichzeitig Fluoreszenz- und Streulicht aus dem Fokus, das anschließend zum überwiegenden Teil den Strahlteiler passiert. Das gestreute Anregungslicht wird durch einen holographischen Bandfilter („Notch-Filter“, Kaiser Optical Systems) der jeweiligen Zentralwellenlänge unterdrückt. Im abbildenden Modus wird das Fluoreszenzlicht daraufhin mit Hilfe eines polarisierenden Strahlteilers in seine Polarisationskomponenten aufgeteilt und deren Intensität mit zwei APDs („Avalanche Photo Diode“, EG&G SPCM 200) gemessen. Aus dem Verhältnis der Intensitäten läßt sich auf die laterale Orientierung der Übergangsdipolmomente der Farbstoffmoleküle in der Probe schließen. Im Spektroskopiemodus wird das Fluoreszenzlicht ausgewählter Moleküle über einen Klappspiegel in den Monochromator (Acton SpectraPro 300i) gelenkt und das Spektrum von einer CCD Kamera (Princeton LN/CCD-100PB, 1340 $\times$ 100 Pixel) aufgenommen, die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  betrieben wird. Das Rastern der Probe und deren Positionierung mit einer Genauigkeit von besser als 5nm wird ermöglicht durch einen regelkreisgesteuerten Rastertisch (PI P-517.K008). Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Farbstoffmoleküle zu verhindern, wurde die Probe nur während der Messungen beleuchtet. Ein AOM (Akustooptischer Modulator, Brimrose TEM-85-10) diente dabei als Schalter, der das Anregungslicht mit Beginn einer Messung in das Mikroskop einkoppelte. Die Anregungsintensität wurde über Graufilter reguliert.

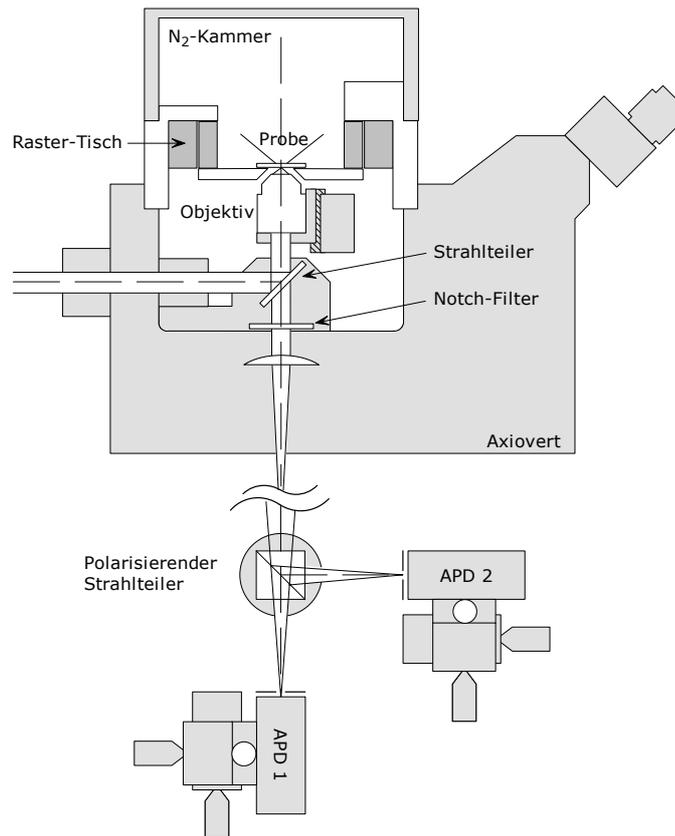


Abbildung 3.5: Die konfokale Optik und der Detektionsstrahlengang des abbildenden Modus. Im Falle der Direkteinkopplung wurde ein dichroitischer Spiegel als Strahlteiler eingesetzt, im Falle der Fasereinkopplung eine planparallele Glasplatte. Der Notch-Filter war jeweils der Anregungswellenlänge angepaßt.

### 3.2.2 Probenpräparation

Da sämtliche Informationen über die untersuchten Moleküle aus deren Fluoreszenzsignal gewonnen werden, die Fluoreszenzparameter jedoch durch die inhomogene Verbreiterung gestreut sind und dazu oft noch in diverse Subensembles zerfallen, ist eine eindeutige Zuordnung zwischen Farbstoff und Einzelmolekülspektrum nicht ohne weiteres möglich. Es besteht daher immer die Wahrscheinlichkeit, fluoreszierende Verunreinigungen in die Untersuchung mit einbezogen zu haben. Um diese Wahrscheinlichkeit zu minimieren, muß erstens der eingesetzte Farbstoff möglichst rein und ausreichend fluoreszent, und zweitens die Matrix nahezu fluoreszenzfrei sein.

Das Maß an Verunreinigungen der Farbstoffe mit farbigen, beziehungsweise fluoreszierenden Substanzen wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Bis

auf  $\text{PIBr}_3$  zeigten alle zufriedenstellende bis hervorragende Reinheit. Im Falle von  $\text{PIBr}_3$  traten Kontaminationen in beträchtlicher Zahl und Konzentration zu Tage, die die Aussagekraft der Resultate für diesen Farbstoff stark einschränken.

Um eine möglichst fluoreszenzfreie Matrix zu erhalten, wurde eine Lösung von 20g Polystyrol (Acros, mittlere molare Masse: 250000 g/mol) pro Liter Toluol (Merck Uvasol) zum Ausbleichen farbiger Kontaminationen über eine Woche mit Weißlicht bestrahlt.

$\sim 10^{-5}\text{M}$  Farbstoff in Toluol wurden mit der Polystyrollösung auf  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}\text{M}$  verdünnt.  $10\mu\text{l}$  dieser Mischung wurden durch „Spincoating“ bei 7000 Umdrehungen pro Minute auf ein Deckgläschen aufgebracht, das zuvor durch Lagerung in Chromschwefelsäure von Verunreinigungen befreit wurde. Die komplette Präparation der Probe erfolgte in einer „Laminar Flow Box“, um nachträgliche Kontaminationen zu vermeiden. Man erhält einen geschlossenen Polystyrolfilm einer Dicke von  $\sim 30\text{nm}$  und einem flächenbezogenen Farbstoffgehalt von maximal  $1\mu\text{m}^{-2}$ . Diese Proben werden zur Messung direkt über dem Objektiv fixiert. Der Probenraum wird bereits mehrere Stunden vor der ersten Messung mit Stickstoff geflutet, damit der im Polystyrol gelöste Sauerstoff entweicht. Dieser wird für viele fluoreszenzdynamische Phänomene verantwortlich gemacht, die an einzelnen Molekülen beobachtet wurden [18].

Zur Überprüfung der Fluoreszenzfreiheit des Trägers und der Matrix wurden analog angefertigte Blindproben vermessen (Abbildung 3.6).

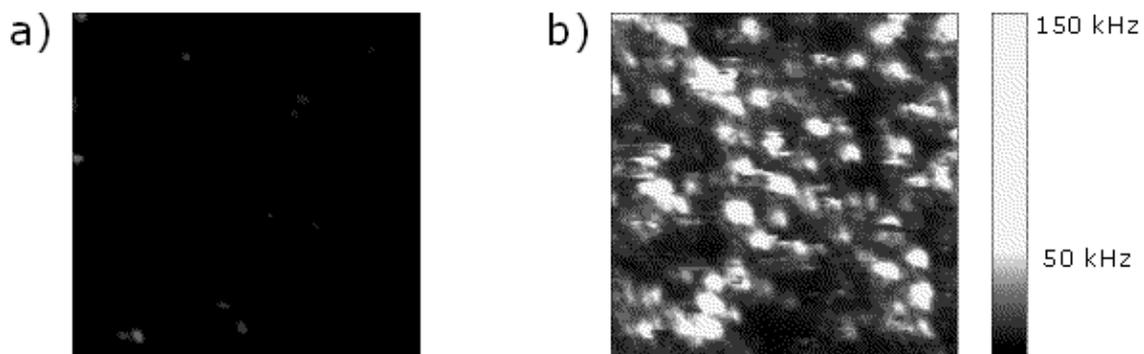


Abbildung 3.6: Fluoreszenzrasterbilder ( $10\times 10\mu\text{m}^2$ ) einer Blindprobe (a) und einer Probe mit  $10^{-9}\text{M}$  DAPI (b). Beide Bilder wurden mit Fasereinkopplung und einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$  bei identischen experimentellen Parametern aufgenommen.

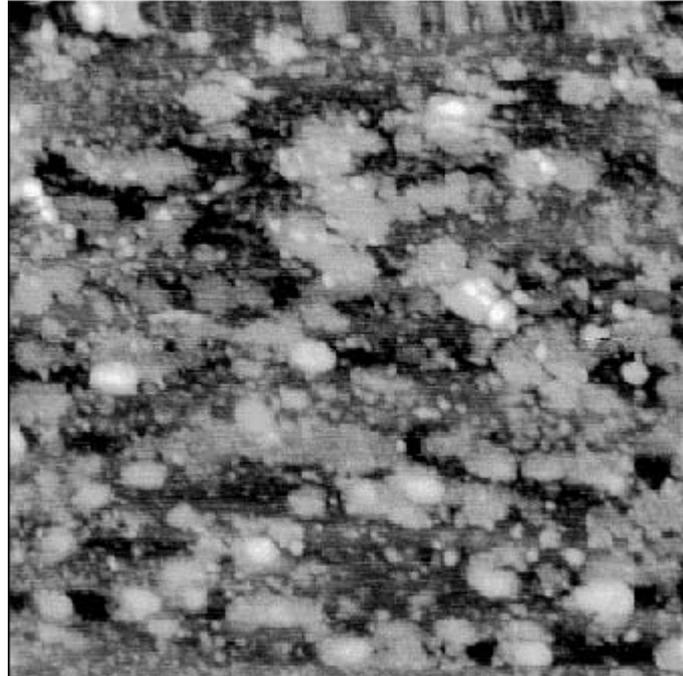


Abbildung 3.7: AFM-Bild der Oberfläche des Polystyrolfilms ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , Tapping Mode). Dargestellt ist die Topographie der Oberfläche, die Regelung erfolgt über die Amplitude. Die Grauskala läuft über eine topographische Tiefe von 15nm.



Abbildung 3.8: Phasenverschiebungsbild des selben Bereichs. Die Grauskala läuft über eine Phase von  $0^\circ$  bis  $30^\circ$ . Aus dieser Darstellung lassen sich Rückschlüsse auf die Verformbarkeit der Oberfläche ziehen. Daß nur Strukturen zu erkennen sind, die auch das Topographiebild zeigt, deutet auf eine homogene Polymerphase hin.

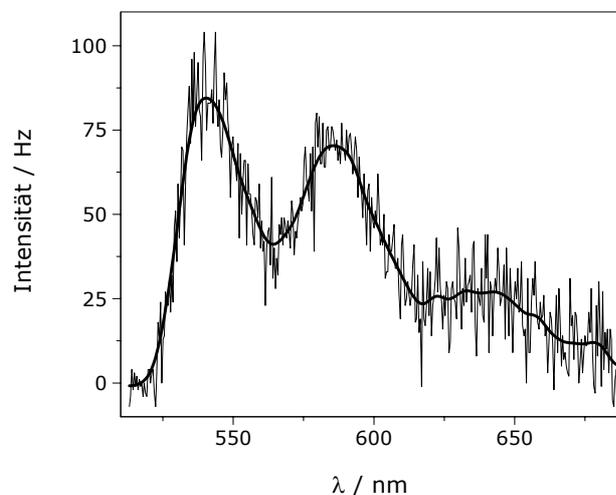
### 3.2.3 Messung & Datenverarbeitung

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurde ein Fluoreszenzrasterbild von meistens  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  aufgenommen. Jeder Ort dieses Probenbereichs kann nun in den Anregungsfokus gefahren und spektroskopisch vermessen werden. Dabei beträgt die Anregungsleistung  $P_{\text{EX}} \sim 1 \text{ kW/cm}^2$  im Fokus. Versuche mit abweichenden Anregungsleistungen zeigten bis auf die geänderte Fluoreszenzrate keine signifikanten Einflüsse auf das spektralen Verhalten der Einzelmoleküle. Vor jeder Meßreihe wird eine dunkle Stelle auf dem Fluoreszenzrasterbild in den Fokus gefahren und ein Hintergrundspektrum unter den aktuellen Bedingungen aufgenommen, das fortan von den Molekülspektren subtrahiert wird.

Es wurden Sequenzen von meist 25 Spektren mit einer Integrationszeit von jeweils 1s aufgenommen. Die Totzeit zum Auslesen der CCD-Kamera zwischen zwei Spektren belief sich auf 20ms. Während dieser Zeit wird die Probe nicht beleuchtet. Die so gewonnenen Rohdaten bestehen aus Spektren mit 670 Datenpunkten im Binärformat. Zur Darstellung und systematischen Analyse der Bandenstruktur werden die Rohdaten durch Faltung mit einer Gaußkurve geglättet und im ASCII-Format ausgegeben.

$$\bar{I}(\lambda) = \int I(\lambda') G(\lambda' - \lambda) d\lambda' \quad (3.2)$$

Abbildung 3.9: Ein typisches Einzelmolekülspektrum (API) mit relativ geringer Intensität als Rohdatensatz und geglättetes Spektrum. Die Bandbreite der Faltungsfunktion ist  $\sigma = 3 \text{ nm}$ . Die beiden kurzwelligen Bandenmaxima sind nach der Glättung rauschfrei, das langwellige nur unzureichend.



Die Bandbreite der Faltungsfunktion wurde so gering wie möglich gewählt, jedoch immer so, daß der Kurvenverlauf an den Bandenmaxima rauschfrei erscheint. So wurde die überwiegende Zahl der Sequenzen mit einer Bandbreite  $\sigma = 3\text{nm}$  geglättet, nur die wenig intensiven Spektrenserien mit niedrigem Signal/Rausch-Verhältnis erforderten eine Bandbreite von  $\sigma = 5\text{nm}$ . Die durch die Faltung hervorgerufene Verfälschung der Schwingungsprogression kann vernachlässigt werden (Abbildung 3.9).

Die geglätteten Sequenzen werden nun vermessen und spektrale Parameter wie Wellenlänge und Intensität der Bandenmaxima, integrale Intensität und spektraler Schwerpunkt protokolliert. Diese, sowie daraus abgeleitete Größen, lassen sich zur Analyse als Trajektorien oder in Histogrammen darstellen, ebenso können jeweils zwei Eigenschaften auf Korrelation untersucht werden.

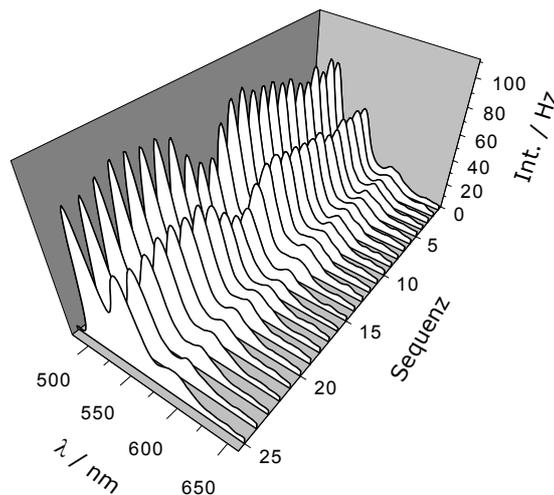


Abbildung 3.10: Typische spektrale Sequenz eines PI Moleküls. Erkennbar ist eine ausgeprägte Dynamik der Fluoreszenzrate, während die spektralen Parameter weitgehend konstant bleiben. Die Integrationszeit pro Spektrum ist 1s.



## 4 Ensembleexperimente

### 4.1 Vergleich des spektralen Verhaltens in Toluol und Polystyrol

Da wegen der Schwierigkeiten bei der Herstellung klarer planparalleler Polystyrolschichten mit hohem Farbstoffgehalt viele Ensemblemessungen in der flüssigen Phase, namentlich in Toluol durchgeführt wurden, sollen zunächst Absorptions- und Fluoreszenzspektren von PI und API in Toluol und Polystyrol verglichen werden. Im Fall von PI zeigt sich dadurch der Einfluß der Umgebungsparameter auf den ungestörten Chromophor, während sich bei API zusätzlich die Umgebungseinflüsse auf den Aminosubstituent bemerkbar machen. Diese Untersuchung dient zur Beurteilung, in wie fern sich Ergebnisse von Messungen in Toluol auf analoge Problemstellungen in Polystyrol, und damit insbesondere solche auf Einzelmolekülebene, übertragen lassen. Aus Tabelle 3-1 wird ersichtlich, daß neben der chemischen Verwandtschaft viele physikalische Eigenschaften, wie UV-Spektrum, Dielektrizitätskonstante, Brechungsindex und Wärmeleitfähigkeit, sehr ähnlich sind. Die wesentlichen Unterschiede resultieren aus dem unterschiedlichen Aggregatzustand, also der Beweglichkeit der Lösungsmittelmoleküle. Die Auswirkungen dieser Unterschiede auf das spektrale Verhalten von PI und API sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Es zeigt sich, daß sowohl die Absorptionsspektren von PI, als auch die von API in beiden Lösungsmitteln nahezu identisch sind. Bei beiden Farbstoffen ist das Spektrum in Polystyrol geringfügig bathochrom verschoben. Ebenso ist das Fluoreszenzspektrum von PI in Polystyrol dem in Toluol sehr ähnlich. Dagegen scheinen die Fluoreszenzspektren von API in auf den ersten Blick stark von den Lösungsmittleigenschaften beeinflusst. Bei näherer Betrachtung zeigt sich jedoch, daß diese Abweichungen nicht grundlegender Natur sind und ebenfalls mit der Beweglichkeit der molekularen Umgebung befriedigend erklärt werden können. Bei beiden Farbstoffen ist eine hypsochrome Verschiebung des Fluoreszenzspektren zu beobachten, bei PI um  $\sim 5\text{nm}$ , bei API immerhin um  $\sim 25\text{nm}$ . Zudem erscheint im Fluoreszenzspektrum von API eine kurzwellige Bande zwischen 560 und 580nm, die im Fall von Polystyrol erheblich intensiver ausfällt. Diese Bande läßt sich, wie in den Abschnitten 4.4 und 5.1 beschrieben, einem Konformationsisomer von API zuordnen.

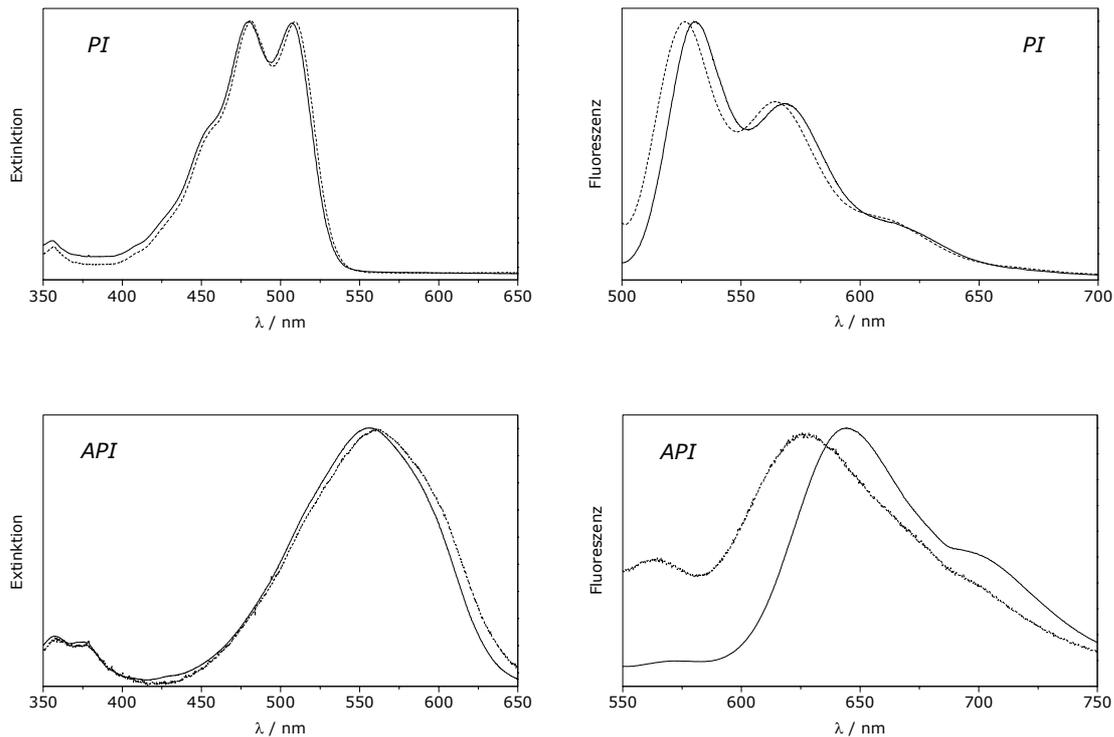


Abbildung 4.1: Normierte Extinktions- und Fluoreszenzspektren von PI und API in Toluol (durchgezogene Linie) und in Polystyrol (unterbrochene Linie).

Die in Polystyrol systematisch verringerte Stokes-Verschiebung zwischen Absorption und Fluoreszenz bei den untersuchten Farbstoffen beruht auf der gehinderten Orientierungsrelaxation der permanenten Umgebungsdipole im Polymer nach einem spektralen Übergang. Das dieser Effekt im Fall von API wesentlich deutlicher ausgeprägt ist, deutet darauf hin, daß sich die Ladungsverteilung zwischen  $S_1$ - und  $S_0$ -Zustand bei diesem Farbstoff stärker unterscheidet als bei PI. Das Phänomen der verringerten Stokes-Verschiebung in hochviskosen Lösungsmitteln ist unter dem Namen Rigidochromie beschrieben worden [37].

Die erhöhte Intensität der kurzwelligen Fluoreszenzbande in Polystyrol, die von dem Konformationsisomeren des API herrührt, läßt sich durch eine verlangsamte Relaxation dieses Konformeren in die im angeregten Zustand stabilere Konformation erklären. In Polystyrol scheint die Zeitkonstante des Konformationswechsels größer als die Fluoreszenzlebensdauer zu werden. Dieser Sachverhalt wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels noch eingehender behandelt.

## 4.2 Quantitative Charakterisierung der Spektren

Um Vergleiche zwischen Einzelmolekül- und Ensemblemessungen zu ermöglichen und die Einflüsse der verschiedenen Substituenten auf das spektrale Verhalten der untersuchten Farbstoffe zu quantifizieren, wurden die Ensemblespektren nach den gleichen Parametern ausgewertet, die für die Einzelmolekülspektren protokolliert werden. Während jedoch die spektralen Parameter insbesondere bei den hochaufgelösten Schwingungsprogressionen von PI und DAPI (und zum Teil auch von API) auf Einzelmolekülebene ohne wesentliche systematische Fehler direkt aus dem jeweiligen Spektrum ablesbar sind, ist das für Ensemblemessungen wegen der inhomogenen Verbreiterung im allgemeinen nicht möglich.

Neben der *direkten* Bestimmung (D) von Wellenlänge und Intensität der Schwingungsbanden aus den Fluoreszenzspektren, kamen zwei weitere Verfahren zur spektralen Analyse zur Anwendung:

Es wird die Summe einer angepaßten Anzahl von *Gaußfunktionen* an das gemessene Spektrum angefitet (GF). Die Fitparameter der Maxima dieser Gaußkurven werden als Wellenlängen und Intensitäten der Schwingungsbanden interpretiert. Diese Methode liefert neben diesen Parameter der Banden zusätzlich deren Bandweite. Bei Spektren mit hinreichender Auflösung der vibronischen Struktur liefert dieses Verfahren zumeist die glaubhaftesten Ergebnisse. Ist aber aus einem Spektrum nicht zu erkennen, aus wie vielen Schwingungsbanden es sich zusammensetzt, oder weichen die spektralen Formen der einzelnen Banden erheblich von der Form einer Gaußkurve ab, so ist diese Methode der Spektralanalyse wenig sinnvoll.

Beim letzten Verfahren werden die 2. Ableitungen der Spektren ausgewertet ( $I''$ ,  $E''$ ). Bei diesen Derivativspektren 2. Ordnung tritt die Bandenstruktur deutlich ausgeprägter zu Tage als im Originalspektrum. Die Krümmungsminima im Derivativspektrum werden dabei einfach den spektralen Maxima zugeordnet. Diese Methode liefert nur die Wellenlängen, nicht aber die Intensitäten der Bandenmaxima. Ihr Vorteil ist, daß zur Auswertung keine vorausgehende Interpretation bezüglich Anzahl und Form der Schwingungsbanden nötig ist.

Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 geben die ermittelten spektralen Parameter aus den Ensemblemessungen wider. Die angewandte Methode ist jeweils angegeben. Die Zusammenstellung der Resultate der verschiedenen Auswertungen (D, GF,  $I''$  bzw.

E'') an allen Spektren, sowie die gemessenen Spektren mit Fitfunktionen und Derivativspektren finden sich in Appendix 7.2.

System	$\lambda_0$ / nm	$\lambda_1$ / nm	$\lambda_2$ / nm	$\Delta\nu_{01}$ / $\text{cm}^{-1}$	$\Delta\nu_{02}$ / $\text{cm}^{-1}$	$\Phi_{1/0}$	$\Phi_{2/1}$
PI in PS <sup>GF</sup>	510,1	481,6	454,0	1160	2422	0,93	0,55
API in PS <sup>E''</sup>	598	559	(522)	1167	(2435)		
DAPI in PS <sup>GF</sup>	512,1	483,6	456,9	1151	2359	0,83	0,59
PIBr <sub>3</sub> PS <sup>E''</sup>	518	480	(445)	1528	(3167)		
PI in PhMe <sup>GF</sup>	507,4	480,2	(455,9)	1116	(2226)	0,73	0,81
API in PhMe <sup>E''</sup>	593	555		1155			
DAPI in PhMe <sup>GF</sup>	510,4	482,2	455,8	1146	2347	0,82	0,62
PIBr <sub>3</sub> in PhMe <sup>E''</sup>	516	478	(445)	1541	(3092)		

Tabelle 4-1: Auswertung der Absorptionsspektren. Die Angaben in Klammern sind mit einer hohen Unsicherheit behaftet. (PS: Polystyrol; PhMe: Toluol)

System	$\lambda_0$ / nm	$\lambda_1$ / nm	$\lambda_2$ / nm	$\Delta\nu_{01}$ / $\text{cm}^{-1}$	$\Delta\nu_{02}$ / $\text{cm}^{-1}$	$\Phi_{1/0}$	$\Phi_{2/1}$
PI in PS <sup>GF</sup>	525,4	564,2	609,5	1309	2626	0,69	0,28
API in PS <sup>I''</sup>	623	(708)		(1927)			
DAPI in PS <sup>GF</sup>	528,0	566,8	612,1	1296	2602	0,75	0,30
PIBr <sub>3</sub> PS <sup>I''</sup>	542	587		1414			
PI in PhMe <sup>GF</sup>	530,1	567,9	614,4	1256	2588	0,70	0,25
API in PhMe <sup>I''</sup>	639	703		1425			
DAPI in PhMe <sup>GF</sup>	531,6	569,2	616,2	1243	2583	0,73	0,25
PIBr <sub>3</sub> in PhMe <sup>I''</sup>	543	586		1351			

Tabelle 4-2: Auswertung der Fluoreszenzspektren. Die Angaben in Klammern sind mit einer hohen Unsicherheit behaftet.

System	$\Delta\lambda_{00}$ / nm	$\Delta\nu_{00}$ / $\text{cm}^{-1}$
PI in PS <sup>GF</sup>	15,3	571
API in PS <sup>E''/I''</sup>	25	671
DAPI in PS <sup>GF</sup>	15,9	588
PIBr <sub>3</sub> PS <sup>E''/I''</sup>	24	855
PI in PhMe <sup>GF</sup>	22,7	844
API in PhMe <sup>E''/I''</sup>	46	1214
DAPI in PhMe <sup>GF</sup>	21,2	781
PIBr <sub>3</sub> in PhMe <sup>E''/I''</sup>	27	964

Tabelle 4-3: Stokes-Verschiebungen der 0→0-Übergänge von Fluoreszenz und Absorption in Wellenlänge und Wellenzahlen.

Auffällig ist zunächst die hohe Ähnlichkeit aller Parameter von PI und DAPI unter gleichen Bedingungen. Der N,N-Di(*tert*-butoxycarbonyl)-amino-Substituent in der 9-Position des DAPI scheint nahezu keinen Einfluß auf das spektrale Verhalten dieses Farbstoffs auszuüben. Erklärbar ist dieser Befund durch den sterischen Anspruch des Substituenten, der die Aminofunktion aus der Resonanz zum Chromophor heraus zwingt. Beim API ist die Resonanz zwischen Aminogruppe und Chromophor für den Großteil der Moleküle nicht unterbrochen. Das führt zu einer erheblichen bathochromen Verschiebung von Absorption und Fluoreszenz, sowie signifikanten Veränderungen aller übrigen spektralen Parameter im Vergleich zur Stammverbindung PI. Die Bromsubstituenten des PIBr<sub>3</sub> führen in beiden Lösungsmitteln sowohl in Absorption, als auch in Fluoreszenz zu bathochromer Verschiebung und einer Streckung der Schwingungsprogression.

Beim Übergang von Toluol zu Polystyrol stellt sich für alle Farbstoffe eine langwellige Verschiebung der Absorption, und eine kurzwellige der Fluoreszenz ein. Diese Reduzierung der Stokes-Verschiebung wurde bereits in Absatz 4.1 für PI und API qualitativ gezeigt und durch die gehinderte Beweglichkeit der Umgebungsdipole im Polystyrol erklärt („Rigidochromie“).

### 4.3 Das Fluoreszenzspektrum von API in Abhängigkeit von $\lambda_{EX}$

Wie bereits in Abschnitt 4.1 angerissen wurde, liegt API sowohl in Toluol als auch in Polystyrol in zwei Konformeren vor. Die eine Konformation führt zur Konjugation zwischen dem Chromophor und dem freien Elektronenpaar der Aminogruppe („in-resonance“-Konformation) und zeigt das unstrukturierte Fluoreszenzspektrum mit Maximum um 640nm. In der anderen Konformation ist die Konjugation unterbrochen und das Fluoreszenzspektrum gleicht dem von PI („off-resonance“-Konformation).

Ist die mittlere Aufenthaltsdauer der API Moleküle in den konformereren Zuständen nicht wesentlich kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer dieser Konformere, sollte die Form des Fluoreszenzspektrums von der Anregungswellenlänge  $\lambda_{EX}$  abhängen. Es wurden daher 10 Fluoreszenzspektren von API mit Anregungswellenlängen zwischen 440 und 570nm aufgenommen. Die erwartete Wellenlängenabhängigkeit wurde sowohl für Toluol, als auch für Polystyrol als Matrix nachgewiesen. Abbildung 4.2 zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten ( $I_{\max}^{\perp}/I_{\max}^{\parallel}$ ) an den

spektralen Maxima der beiden Konformere bei  $\lambda_{\max}^{\perp} \approx 528\text{nm}$  und  $\lambda_{\max}^{\parallel} \approx 640\text{nm}$ . Die Abhängigkeit dieses Quotienten von der Anregungswellenlänge ist in Polystyrol wesentlich stärker ausgeprägt als in Toluol. Diese Beobachtung läßt sich dadurch erklären, daß die Konformationsumwandlung durch die drastisch höhere Viskosität des Polystyrols stark verlangsamt ist.

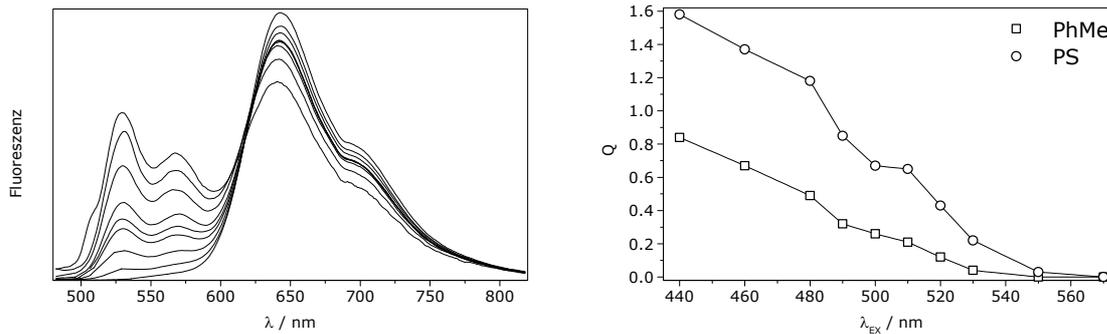


Abbildung 4.2: (Links) Die Fluoreszenzspektren von API in Toluol bei den Anregungswellenlängen  $\lambda_{\text{EX}} = 440, 460, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 550$  und  $570\text{nm}$ . Die Spektren sind auf die Absorption der Probe bei der jeweiligen Anregungswellenlänge normiert. (Rechts) Das Verhältnis der Bandenintensitäten an den spektralen Maxima der beiden Konformere  $Q = (I_{\max}^{\perp}/I_{\max}^{\parallel})$  in Toluol (PhMe) und Polystyrol (PS). Wegen der verlangsamt Konformationsumwandlung in Polystyrol nimmt  $Q$  in dieser Matrix höhere Werte an. In den signifikant erhöhten Werten bei  $480$  und  $510\text{nm}$  spiegeln sich die Absorptionsmaxima der „off-resonance“-Konformation wider.

Werden die Fluoreszenzspektren, die mit den unterschiedlichen  $\lambda_{\text{EX}}$  aufgenommen wurden, auf die Absorption der untersuchten Probe bei  $\lambda_{\text{EX}}$  normiert dargestellt, erhält man einen Punkt, den alle Spektren durchlaufen (ähnlich einem isobestischen Punkt). Diese Fluoreszenzspektren lassen sich aus den auf ihre Maxima normierten Spektren der isolierten Konformere  $i(\lambda)$  folgendermaßen konstruieren:

$$I(\lambda) = \frac{I_{\max}^{\perp} \cdot i^{\perp}(\lambda) + I_{\max}^{\parallel} \cdot i^{\parallel}(\lambda)}{(F^{\perp} \cdot I_{\max}^{\perp} / \phi^{\perp}) + (F^{\parallel} \cdot I_{\max}^{\parallel} / \phi^{\parallel})} \quad (4.1)$$

mit

$$F = \int i(\lambda) d\lambda \quad (4.2)$$

$\phi^\perp$  und  $\phi^\equiv$  sind die Fluoreszenzquantenausbeuten der isolierten Konformere. Der Nenner des Ausdrucks dient der Normierung auf  $A(\lambda_{\text{EX}})$  und stellt ein Maß für die Depopulationsrate des  $S_1$ -Zustands dar, die bei konstanter Beleuchtung gleich der Zahl der absorbierten Photonen pro Zeit ist. Kürzen mit  $I_{\text{max}}^\equiv$  ergibt:

$$I(\lambda) = \frac{(I_{\text{max}}^\perp / I_{\text{max}}^\equiv) \cdot i^\perp(\lambda) + i^\equiv(\lambda)}{(I_{\text{max}}^\perp / I_{\text{max}}^\equiv) \cdot \frac{F^\perp}{\phi^\perp} + \frac{F^\equiv}{\phi^\equiv}} \quad (4.3)$$

Am gemeinsamen Punkt aller Fluoreszenzspektren muß  $I(\lambda)$  unabhängig von dem Quotienten  $(I_{\text{max}}^\perp / I_{\text{max}}^\equiv)$  werden, daher gilt:

$$\frac{\partial I(\lambda)}{\partial (I_{\text{max}}^\perp / I_{\text{max}}^\equiv)} = 0 \quad (4.4)$$

Dieser Ansatz führt für die Wellenlänge des gemeinsamen Punkts,  $\lambda^*$ , zu:

$$\frac{\phi^\equiv}{\phi^\perp} = \frac{i^\perp(\lambda^*)}{i^\equiv(\lambda^*)} \cdot \frac{F^\equiv}{F^\perp} \quad (4.5)$$

Ist es also möglich, die Fluoreszenzspektren der isolierten Konformer  $i(\lambda)$  zu ermitteln, so läßt sich das Verhältnis der Fluoreszenzquanteneffizienzen der Konformationsisomeren direkt bestimmen.

Als Fluoreszenzspektrum der isolierten „in-resonance“-Form wurde im untersuchten Fall das mit der Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{EX}} = 570\text{nm}$  verwendet. Das Spektrum der isolierten „off-resonance“-Form wurde durch Linearkombination der Spektren mit den Anregungswellenlängen  $\lambda_{\text{EX}} = 570\text{nm}$  und  $\lambda_{\text{EX}} = 460\text{nm}$  konstruiert. Der gemeinsame Punkt aller Spektren  $\lambda^*$  liegt für API in Toluol bei  $616,5 \pm 1,5\text{nm}$ . Nach

Gleichung 4.5 ergibt sich damit ein Verhältnis von  $(\phi^{\perp}/\phi^{\parallel}) = 1 : 0,63 \pm 0,19$ . Da die Reabsorption in der Probe sowohl die spektrale Form, als auch die integrale Intensität der Fluoreszenz beeinflusst, wurden die Messungen an einer Probe mit nur  $\sim 0,025$  Absorption am Hauptmaximum durchgeführt. Dies führt leider zu relativ hohen Unsicherheiten bei der Bestimmung der Absorption an den Anregungswellenlängen, insbesondere bei den  $\lambda_{\text{EX}}$  weitab vom Hauptmaximum. Das ermittelte Verhältnis von  $(\phi^{\perp}/\phi^{\parallel}) = 1 : 0,63$  in Toluol erstaunt zunächst, da das Verhältnis der Fluoreszenzeffizienzen von DAPI (das bisweilen als Modellsubstanz des „off-resonanz“-Konformers von API dient) zu API zu  $(\phi_{\text{DAPI}}/\phi_{\text{API}}) = 1 : 0,29$  bestimmt wurde [38]. Im Unterschied zum DAPI existiert für die „off-resonance“-Form des API jedoch ein zusätzlicher Desaktivierungsmechanismus, und zwar die Konformationsumwandlung im angeregten Zustand. Deren Geschwindigkeitskonstante ist, wie am Anfang des Abschnitts diskutiert wurde, mit der der Fluoreszenz vergleichbar. Dies führt zu einer wesentlichen Absenkung der Fluoreszenzeffizienz des „off-resonance“-Konformers von API.

Für die Polystyrolmatrix ließ sich wegen experimenteller Schwierigkeiten keine sinnvolle Auswertung durchführen. Wegen des verlangsamten Konformationsübergangs wäre in dieser Matrix ein Verhältnis  $(\phi^{\perp}/\phi^{\parallel}) > 1 : 0,63$  zu erwarten.

#### **4.4 Protonierung der 9-Aminogruppe des API**

Im Vorfeld wurde bereits mit der Interpretation gearbeitet, die das spektrale Verhalten von API als Überlagerung dessen zweier spektraler Subensembles beschreibt. Die unterschiedlichen Spektren dieser Subensembles wurden als Folge verschiedener Torsionswinkel zwischen Chromophor und Aminogruppe gedeutet. Die Konformation, die eine Resonanz zwischen Chromophor und Aminogruppe zuläßt, führt demnach zu dem breiten, langwelligen Spektrum und zu der relativ geringen Fluoreszenzquantenausbeute. Die Konformation mit unterbrochener Resonanz bildet das andere Subensemble, dessen Spektrum denen von PI und DAPI gleicht.

Zur Überprüfung dieser Interpretation soll die Resonanz zwischen der 9-Aminogruppe und dem  $\pi$ -System des Perylens gezielt unterbrochen werden. Dazu wird das freie Elektronenpaar der Aminogruppe protoniert. Dieses Experiment wurde nicht in Toluol durchgeführt, da hier geladene Teilchen nicht ausreichend

solvatisiert werden und scheinbar gekoppelte Gleichgewichte vorliegen, beispielsweise über Ionenpaare. Statt dessen wurde das relativ polare, jedoch aprotische Lösungsmittel Acetonitril benutzt. Es wurden Absorption- und Fluoreszenzspektren von API in Acetonitril mit verschiedenen Konzentrationen Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen (Abbildung 4.3). Es zeigt sich, daß zunehmender Säuregehalt tatsächlich zur Ausbildung von Fluoreszenz- und Absorptionsbanden führt, die denen von PI und DAPI gleichen. Während in der Absorption ein isobestischer Punkt erscheint, der auf ein einfaches Gleichgewicht der Form



im Grundzustand hindeutet, wird die „off-resonance“-Bande im Fluoreszenzspektrum offensichtlich durch den Säuregehalt beeinflusst. Des weiteren scheint die Fluoreszenzquantenausbeute der „in-resonance“-Konformation stark reduziert, was auf eine weitergehende Beeinflussung des angeregten Zustand durch die Gegenwart der Säure hinweist.

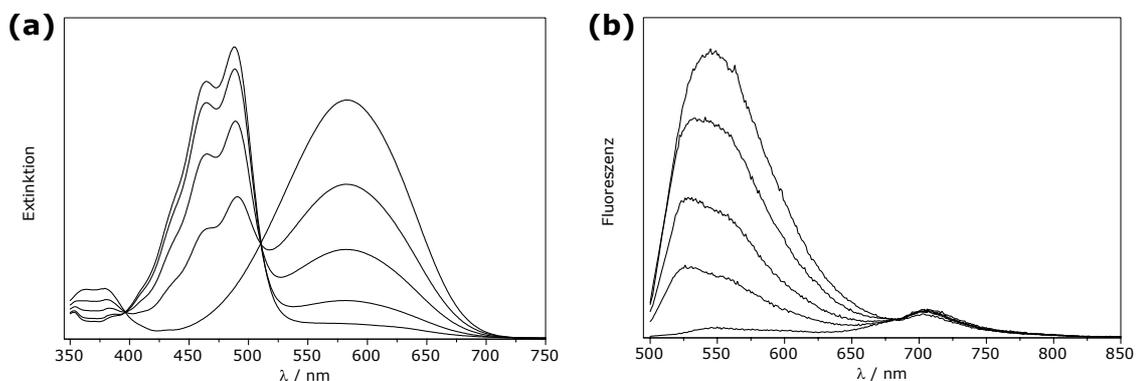


Abbildung 4.3: Absorptions- (a) und Fluoreszenzspektren (b) von API in Acetonitril als Funktion der Säurekonzentration (0, 7, 13, 26, 52mM). Die Protonierung der Aminofunktion führt zur Ausbildung einer dem PI-Spektrum ähnlichen Absorptionsbande. Bei 390 und 511nm treten isobestische Punkte auf. Die Fluoreszenzspektren wurden unter Anregung an der isobestischen Wellenlänge bei 511 nm aufgenommen.

Die gezielte Unterbrechung der Resonanz durch Protonierung der Aminogruppe führt offensichtlich zu Ergebnissen, die die Interpretation des spektralen Verhaltens von API als Überlagerung des Verhaltens zweier, sich durch ihre Konformation unterscheidender Subensembles unterstützt.

#### 4.5 Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses der Konformere

Beim Vergleich der hochaufgelösten Absorptions-Derivativspektren 2. Ordnung von API und DAPI fällt auf, daß den drei Hauptkrümmungsminima bei DAPI drei schwach ausgeprägte Minima bei API spektral entsprechen (Abbildung 4.4). Vor dem Hintergrund des Auftretens von API in den zwei beschriebenen Erscheinungsformen drängt sich die Deutung dieser Minima als Beitrag des „off-resonance“-Konformers auf. Diese Interpretation eröffnet die Möglichkeit, das Konzentrationsverhältnis der beiden Konformere abzuschätzen.

Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 0 bis  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  DAPI in Toluol angesetzt. Jede dieser Lösungen enthielt zudem einen konstanten Gehalt von  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  API. Die Derivativspektren 2. Ordnung dieser Konzentrationsreihe sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Anhand der unter Abschnitt 3.1 beschriebenen Methoden (2B, 2PN, 2PF) zur quantitativen Auswertung von Derivativspektren wurden dann analytische Eichgeraden ermittelt.

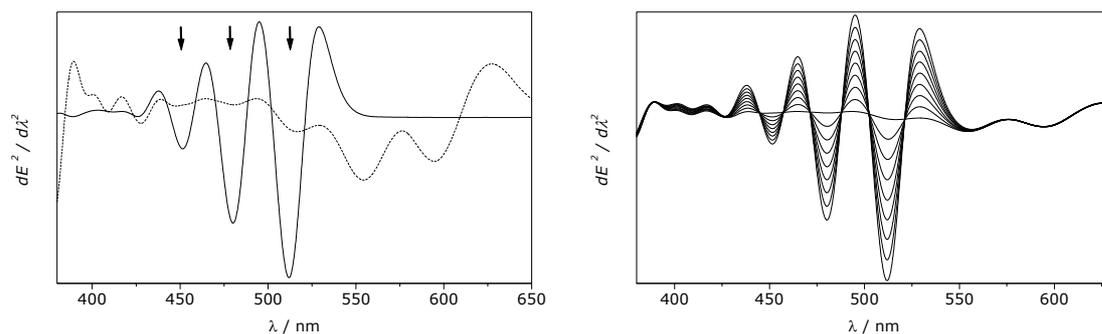
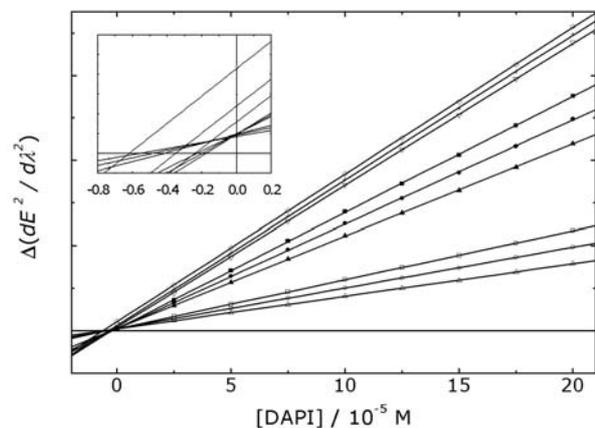


Abbildung 4.4: (links) Derivativspektren 2. Ordnung von API (unterbrochene Linie) und DAPI (durchgezogene Linie). Die korrespondierenden Banden sind mit Pfeilen markiert. (rechts) Die analog dargestellten Spektren der DAPI-Konzentrationsreihe.

Da diese Eichgeraden um den Wert, der durch das API-„off-resonance“-Konformer hervorgerufen wird, in Ordinatendichtung verschoben sind, lässt sich dessen Konzentration am Abszissenabschnitt ablesen. Dabei wird vorausgesetzt, daß das Spektrum von „off-resonance“-API und das von DAPI nahezu identisch sind. Die nach den verschiedenen Methoden (siehe Abbildung 3.2) an den drei Banden ermittelten Ergebnisse streuen sehr stark (Abbildung 4.5), jedoch lassen sie sich anhand ihrer linearen Korrelation und der unter [34] beschriebenen Kriterien bezüglich der gegenseitigen Beeinflussung der Banden bei den unterschiedlichen Methoden beurteilen.

Abbildung 4.5: Die mit den Verfahren 2B, 2PN und 2PF an der drei Banden aufgenommenen Eichgeraden. Der API-„off-resonance“-Gehalt ist am Abszissenabschnitt direkt ablesbar. (Reihenfolge mit steigenden Werten: 452nm /2PF, /2B, /2PN, 481nm /2PF, /2B, /2PN, 510nm /2PF, /2B, /2PN)



Bande / Methode	$[API^+]/10^{-6} \text{ M}$	$K^\perp = [API^+]/[API^-]$	$\Delta G^0 / \text{kJ mol}^{-1}$	Beurteilung
452nm / 2PF	0,53	0,0265	8,8	a
452nm / 2B	0,49	0,0245	9,0	a / c
452nm / 2PN	0,42	0,0210	9,4	a / c
481nm / 2PF	0,22	0,0110	11,0	
481nm / 2B	0,19	0,0095	11,3	c
481nm / 2PN	0,17	0,0085	11,6	c
510nm / 2PF	0,23	0,0115	10,9	b
510nm / 2B	0,35	0,0175	9,9	b / c
510nm / 2PN	0,62	0,0310	8,5	c

Tabelle 4-4: Konzentrationen, Konstanten, und freie Umwandlungsenthalpien (bei 20°C) des Konformationswechsels für API in Toluol nach den verschiedenen Verfahren. Dabei wird die Näherung  $[API^-] \approx [API]_0$  benutzt. Bei der Beurteilung bedeuten a) unsicherer Meßwert, b) schlechte Korrelation und c) unpassende Methode.

Für die Gleichgewichtskonstante  $K^{\perp} = [\text{API}^{\perp}]/[\text{API}^{\text{f}}]$  in Toluol zeichnet sich nach der Beurteilung ein ungefährender Wert von 0.01 ab. Da die Gleichgewichtskonstante bei der Bestimmung der freien Umwandlungsenthalpie  $\Delta G^{\theta}$  nach

$$\Delta G^{\theta} = -RT \cdot \ln K^{\perp} \quad (4.6)$$

logarithmisch eingeht [35], ist die Streuung für diese Größe verhältnismäßig gering.  $\Delta G^{\theta}$  beträgt nach der hier durchgeführten Messung ungefähr 11 kJ/mol.

Da der drastische Unterschied in der Viskosität zwischen Toluol und Polystyrol in erster Linie die kinetischen Eigenschaften beeinflusst, und weniger die thermodynamischen, ist es wahrscheinlich, daß die ermittelten Werte näherungsweise auf die Polystyrolmatrix übertragbar sind.

Eine analoge Auswertung an Fluoreszenzspektren würde zu keinem sinnvollen Ergebnis führen, da sich die Population des  $S_1$ -Zustands bei API bezüglich der Konformation der 9-Aminogruppe innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer noch nicht im Gleichgewicht befindet.

#### **4.6 Zusammenfassung**

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Eigenschaften der für die Einzelmolekülstudien verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Matrizes auf klassisch-spektroskopische Weise bestimmt. Besonderes Augenmerk galt dabei dem 9-amino-substituierten Derivat API. Durch Protonierung der Aminofunktion wurde gezeigt, daß eine Unterbrechung der Resonanz zwischen Aminogruppe und Chromophor durch Konformationsänderung Absorptions- und Fluoreszenzspektren hervorrufen, die denen der unsubstituierten Stammverbindung PI entsprechen. Die Bezeichnungen „in-resonance“ und „off-resonance“-Spektrum, beziehungsweise -Konformer wurden dementsprechend eingeführt.

Es wurde die Übertragbarkeit spektraler Daten aus Messungen in Toluol auf die Polystyrolmatrix überprüft. Diese ist danach für PI, DAPI und  $\text{PIBr}_3$  weitgehend gegeben. Im Fall von API jedoch tritt starke Rigidochromie (Abhängigkeit der Stokes-Verschiebung von der Lösungsmittelviskosität) in Erscheinung. Dies deutet

auf einen großen Unterschied der Dipolmomente in  $S_1$ - und  $S_0$ -Zustand hin. Zudem finden sich im Fluoreszenzspektrum von API in Polystyrol deutliche Banden der „off-resonance“-Form, die in Toluol kaum sichtbar sind. Als Ursache dieser Beobachtung wurde die verlangsamte Konformationsrelaxation in fester Lösung identifiziert.

Da die Gleichgewichtseinstellung der Konformere von API selbst in Toluol nicht deutlich schneller abläuft als die Fluoreszenz, zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzspektrums von der Anregungswellenlänge. Durch die Auswertung der auf die Absorption der Probe normierten Fluoreszenzspektren bei verschiedenen Anregungswellenlängen gelang die Abschätzung der Fluoreszenzquantenausbeute des „off-resonance“- relativ zum „in-resonance“-Konformer (0,63 : 1).

Das Konzentrationsverhältnis der Konformere in Toluol wurde über die Abszissenabschnitte der analytischen Eichgeraden einer DAPI-Konzentrationsreihe mit konstantem API-Gehalt abgeschätzt. Zu diesem Zweck wurden die Absorptionsderivativspektren 2. Ordnung vermessen. Der Mengenanteil des „off-resonance“-Konformers bei Raumtemperatur beträgt demnach  $\sim 1\%$ , die freie Umwandlungsenthalpie zwischen den Konformeren  $\Delta G^0 \approx 11$  kJ/mol.

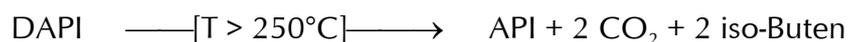
Für alle Farbstoffe wurden auf verschiedene Weise (Direktablesung, Anfitten von Gaußkurven, Derivativspektroskopie) die spektralen Kenngrößen, Lage und Intensität der Bandenmaxima ( $\lambda_{\max}$ ,  $I_{\max}$ ), Verhältnisse der Bandenintensitäten ( $\Phi_{kl}$ ) und Abstände innerhalb der Schwingungsprogression ( $\Delta\nu_{kl}$ ), bestimmt und stehen zum Vergleich mit den Resultaten der Einzelmolekülmessungen zur Verfügung.



## 5 Einzelmolekülspektroskopie

### 5.1 Experimente mit $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$

Bei den ersten Einzelmolekülexperimenten an der Farbstoffklasse der Perylencarboximide wurde das Anregungslicht direkt eingekoppelt (Abbildung 3.3). Zur Anregung wurde die 514,5nm Linie des Argonionenlasers verwendet, um zu gewährleisten, daß DAPI- und API-Moleküle im Mittel etwa den gleichen Absorptionsquerschnitt an der Anregungswellenlänge aufweisen. Eine der ursprünglichen Intentionen zur Untersuchung von Farbstoffen der Perylencarboximidklasse war die kontrollierte Auslösung einer chemischen Reaktion an einem einzelnen Molekül und deren simultane spektrale Verfolgung. Dazu sollte die thermisch ausgelöste Fragmentierung



durch Applikation einer lokal begrenzten Wärmequelle auf eine DAPI-Einzelmolekülprobe benutzt werden. Zunächst sollten von beiden Farbstoffen große Zahlen von Einzelmolekülspektren aufgenommen und charakterisiert werden, um anschließend bei der Verfolgung der Fragmentierung sicher zwischen den Spektren des Edukts und denen des Produkts unterscheiden zu können. Überraschenderweise wurde im Fall von API nicht die erwartete Übereinstimmung zwischen dem Emissionsverhalten einzelner Moleküle und dem Ensemble-Fluoreszenzspektrum gefunden (Abbildung 5.1). Statt dessen verhielt sich die überwiegende Mehrheit der beobachteten API-Moleküle spektral wie DAPI. Die Erklärung für diesen Befund ist, daß API in zwei, sich spektral stark unterscheidenden Konformationsisomeren auftritt, also in zwei Subensemble zerfällt (Abbildung 5.2). Dabei stellt das Konformere mit Konjugation zwischen dem freien Elektronenpaar am Amino-Stickstoff und dem chromophoren  $\pi$ -System das eigentlich vorherrschende Isomere von API dar. Das Spektrum dieser „in-resonance“-Konformation ist nahezu identisch mit dem Ensemblespektrum von API, ebenso ist jedoch deren Fluoreszenzquantenausbeute ähnlich niedrig wie der Ensemblewert ( $\phi_{\text{F}} = 0,2$ ). Das andere Konformere weist eine aus der Konjugation zum Chromophor heraus gedrehte Aminogruppe auf. Spektral verhält sich diese

„off-resonance“-Konformation wie DAPI. Bei DAPI ist die Konjugation zwischen Chromophor und dem Stickstoff in der 9-Position durch dessen sterisch anspruchsvolle Substituenten grundsätzlich unterbrochen. Auch bezüglich der Fluoreszenzquantenausbeute verhält sich die API-„off-resonance“-Form dem DAPI ähnlich ( $\phi_F = 0,7$ ). Bei Einzelmolekülexperimenten erfolgt nun eine subjektive Auswahl der zu untersuchenden Moleküle. Auswahlkriterien sind dabei Eigenschaften, die Molekül als separates, vom Hintergrund gut abgehobenes Fluoreszenzsignal erscheinen lassen, daher im wesentlichen die Fluoreszenzquantenausbeute. Ist dieses Auswahlkriterium, wie im Fall von API, mit dem Zuordnungskriterium in die verschiedenen Subensembles, hier die spektrale Erscheinungsform, verknüpft, so wird ein Subensemble in der Einzelmoleküluntersuchung zu stark gewichtet (gemäß Absatz 2.4.2). In dem hier betrachteten Fall wurden das „off-resonance“-Subensemble erheblich übergewichtet, was zu der Diskrepanz zwischen der Einzelmolekülstudie und dem Ensembleexperiment führte.

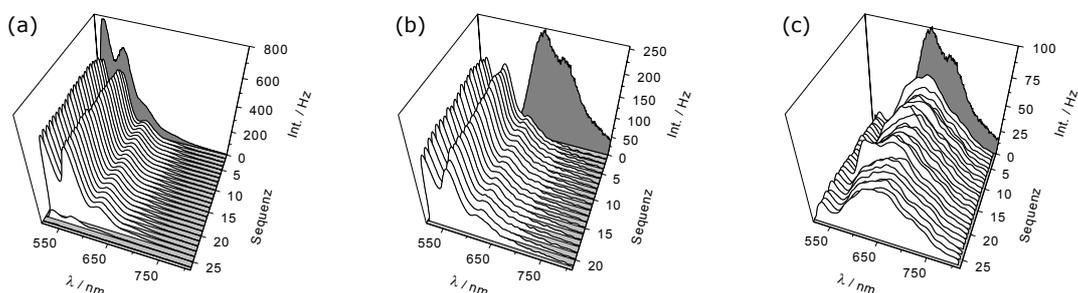


Abbildung 5.1: Einzelmolekülfluoreszenz-Sequenzen. Im Hintergrund ist jeweils das zugehörige Ensemble-Fluoreszenzspektrum grau dargestellt. (a) Eine typische Sequenz von DAPI Spektren mit Maxima bei  $\sim 534$ ,  $\sim 575$  und  $\sim 620$  nm. Der unter (b) gezeigte spektrale Typ wurde bei einzelnen API Molekülen überwiegend beobachtet. Die Bandenstruktur mit Maxima bei  $\sim 534$ ,  $\sim 574$  und  $\sim 626$  nm gleicht der von DAPI, weicht jedoch vom API-Ensemblespektrum stark ab. (c) Der hier gezeigte spektrale Typ von API weist eine unstrukturierte Bandenform mit einem Maximum bei  $\sim 650$  nm und somit eine gute Übereinstimmung mit dem Ensemblespektrum auf. Dieser Typ muß zur Erklärung des Ensembleverhaltens erheblich überwiegen, im Einzelmolekülexperiment jedoch wird er aufgrund seiner niedrigen Fluoreszenzquanteneffizienz nur sporadisch beobachtet [36].

Abbildung 5.2: Veranschaulichendes Energieprofil mit einer idealisierten Darstellung der Konformere von API. Das auf der linken Seite gezeigte „off-resonance“-Isomere führt zu einem dem ungestörten Chromophor analogen Fluoreszenzspektrum, vergleichbar denen von PI und DAPI. Rechts ist das „in-resonance“-Isomere und dessen Fluoreszenzspektrum dargestellt [36].

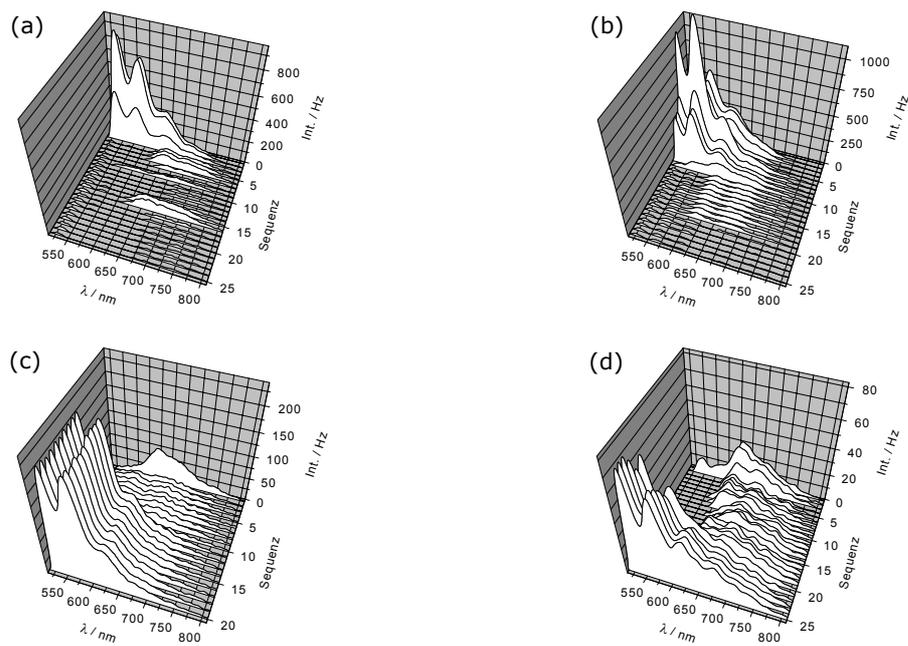
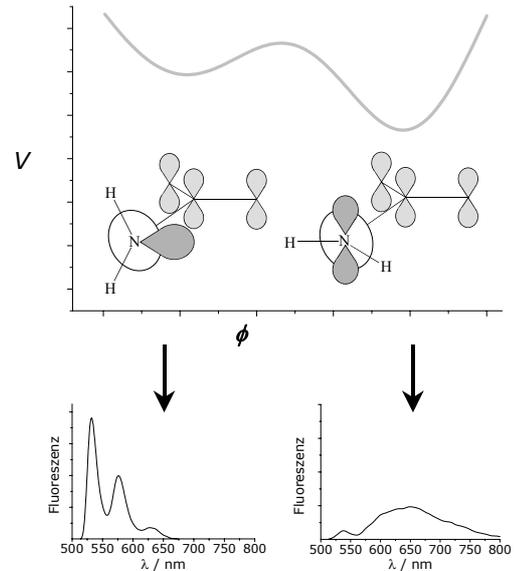


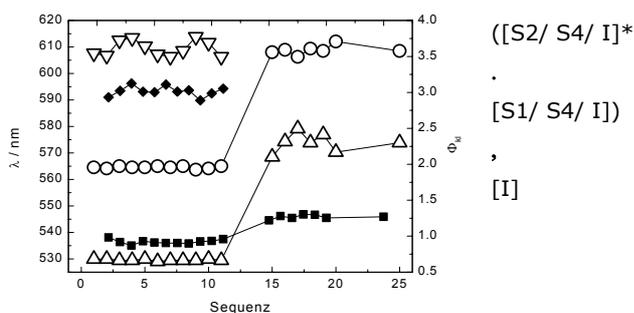
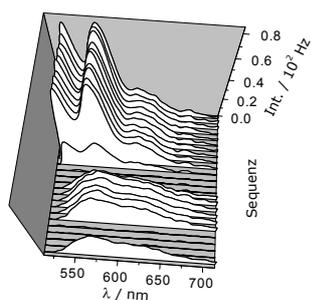
Abbildung 5.3: Spektroskopisch verfolgte Sprünge in der Konformation des 9-Aminostickstoffs bei API. Der Übergang erfolgt bei (a) und (b) von der von der „off-“ zur „in-resonance“-Konformation, bei (c) und (d) in umgekehrter Richtung. Bei (a) und (c) sind zusätzlich Sprünge in nicht fluoreszierende Zustände sichtbar. In allen Fällen ist der signifikante Unterschied in der Fluoreszenzquanteneffizienz zwischen den Konformeren deutlich erkennbar [36].

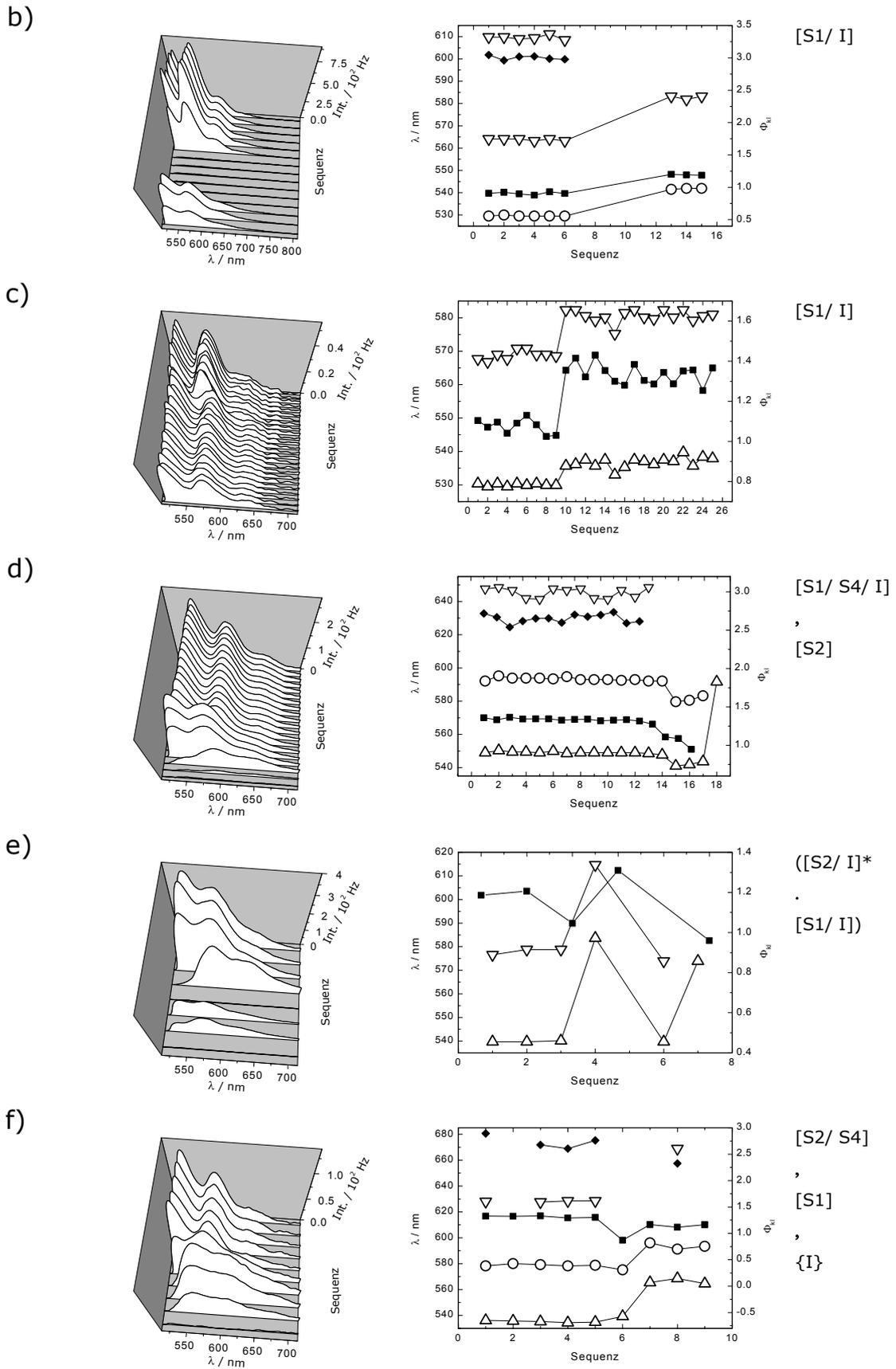
Vor diesem Hintergrund ließen sich einige der beobachteten dynamischen Phänomene in den spektralen Sequenzen bei API mit hoher Sicherheit als Sprung zwischen den beschriebenen Konformationen interpretieren. Beispiele für diesen Konformationsübergang gibt Abbildung 5.3. Dieser Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Konformation ist ein typisches Beispiel für einen intrinsischen Prozeß im Sinne von Abschnitt 2.5.1.

Die Zuordnung der zwei unterschiedlichen spektralen Erscheinungsformen von API auf Einzelmolekülebene zu den Zuständen mit verschiedener Konformation zwischen Chromophor und dem Stickstoffs in der 9-Position basiert auf den Ergebnissen der Ensembleexperimente [36]. So weist die spektrale Ähnlichkeit zwischen DAPI und der Stammverbindung PI darauf hin, daß der Stickstoff in 9-Position keinen wesentlichen Einfluß auf das spektrale Verhalten hat, wenn sein freies Elektronenpaar, hier durch die voluminösen Substituenten, an der Konjugation mit dem Chromophor gehindert ist (vergleiche Abschnitt 4.2). Die Unterbrechung der Amino-Chromophor-Resonanz durch Protonierung der Aminogruppe bei API führte ebenfalls zum Auftreten von Absorptions- und Fluoreszenzbanden, die für das unsubstituierte Perylendicarboximid charakteristisch sind (vergleiche Abschnitt 4.4).

Bei der Sichtung der aufgenommenen Daten von API und DAPI zeigte sich, daß insbesondere die sehr gut aufgelöste Schwingungsstruktur des „off-resonance“-Spektrums (Abbildung 5.1, (a) und (b)) eine detaillierte Beschreibung und Klassifizierung der spektralen Form und Dynamik gemäß Abschnitt 2.3 zulassen. Einige Beispiele spektraler Dynamik unterschiedlicher Ausprägung finden sich in Abbildung 5.4.

a)





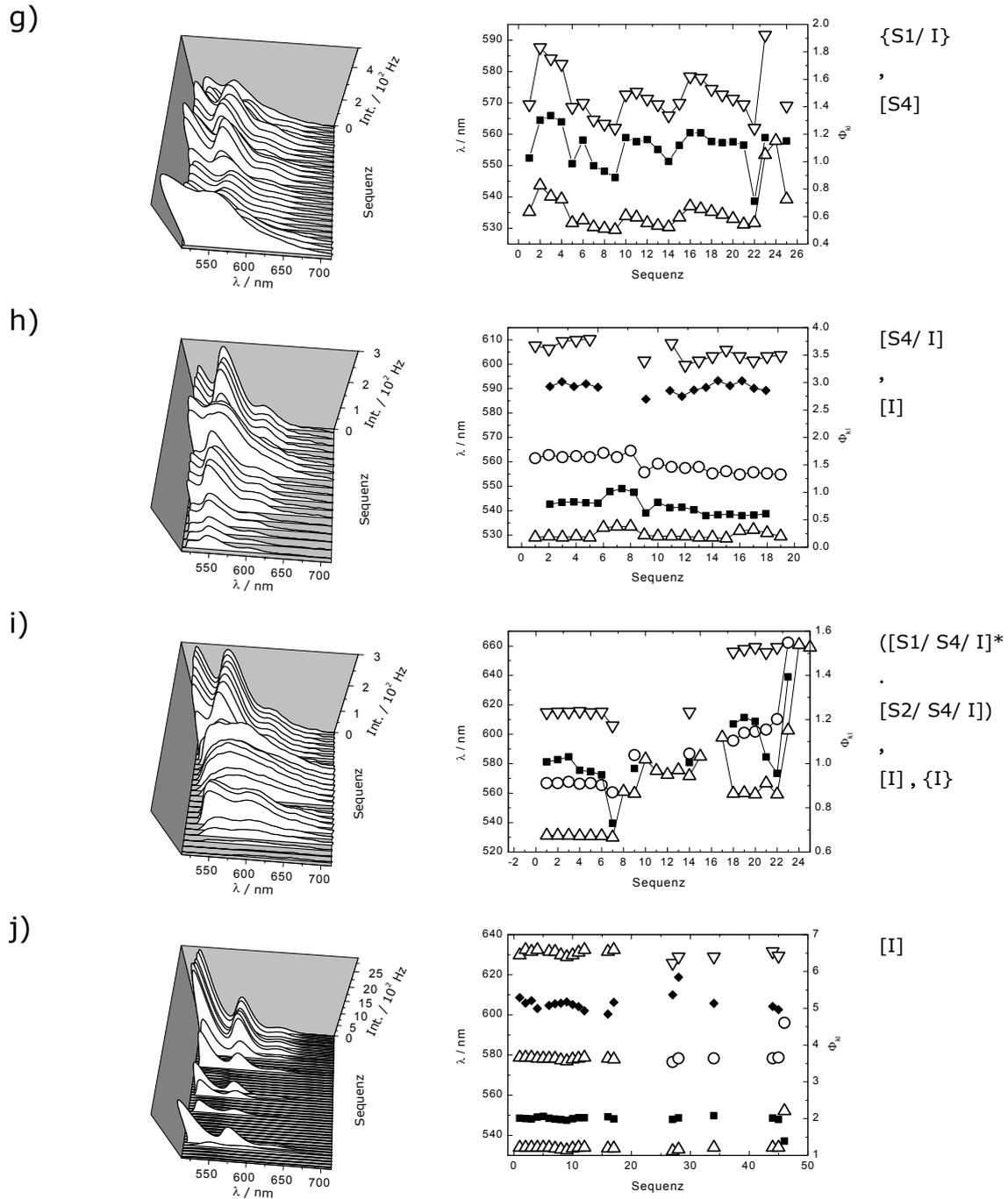


Abbildung 5.4: Beispiele spektraldynamischer Phänomene und deren Beschreibung nach Abschnitt 2.3.2. In der linken Spalte ist der wesentliche Ausschnitt aus der jeweiligen Sequenz dargestellt. In der mittleren Spalte sind die Trajektorien der Bandenmaxima  $\lambda_{\max}$  (offene Symbole) und der Bandenintensitätsverhältnisse  $\Phi_{kl}$  (geschlossene Symbole) aufgetragen. Die Zuordnung der Symbole zu den Datenpunkten der Trajektorien ist durch die Struktur der Protokolldatei festgelegt und hat keine physikalische Bedeutung. So gehören in (a) die offenen Kreise des zweiten Maximums bis zum 11. Spektrum mit großer Wahrscheinlichkeit zur selben Schwingungsbande  $\lambda$  wie die offenen Dreiecke des ersten Maximums nach dem 15.

Spektrum. In der rechten Spalte werden die beobachteten Phänomene mit den in Abschnitt 2.3.2 eingeführten Begriffen beschrieben. Dabei werden Sprünge in eckigen Klammern und Diffusionsprozesse in geschwungenen Klammern angegeben. Finden in dem gezeigten Ausschnitt der Sequenz mehrere unabhängige spektrale Änderungen statt, werden diese mit einem , (logisches „und“) verbunden. Ist ein Phänomen nicht eindeutig klassifizierbar, werden die möglichen Beschreibungen mit einem . (logisches „oder“) verbunden, wobei die wahrscheinlichste Deutung mit einem Stern gekennzeichnet sind. Bei einigen Sequenzen (b, c, d, g, h) scheint mit steigender Wellenlänge der Bandenmaxima auch der Wert des Intensitätsverhältnisses  $\Phi_{01}$  anzusteigen. Diese scheinbare Kopplung der spektralen Prozesse S1 und S2 ist jedoch ein Artefakt: Bei relativ kurzwelligen Spektren ist die  $0' \rightarrow 0$ -Bande durch die flache Transmissionskurve des dichroitischen Spiegels abgeschwächt. Verschiebt sich nun das Fluoreszenzspektrum des untersuchten Moleküls bathochrom, gelangt die  $0' \rightarrow 0$ -Bande in einen Bereich höherer Transmission und scheint dadurch an Intensität zu gewinnen.

Jedoch erwiesen sich die mit  $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$  gewonnenen Sequenzen wegen eines systematischen Fehlers bei der Spektrenaufnahme als nicht geeignet, um über ihre statistische Auswertung zu spezifischen Aussagen für das Farbstoff/Matrix-System zu gelangen. Unter den bei dieser Meßreihe vorliegenden Bedingungen überschneidet sich die Anregungswellenlänge mit einem Großteil der Fluoreszenzspektren an deren kurzwelligsten Schwingungsbande. Relativ kurzwellig verschobene Spektren werden daher an ihrer hypsochromen Flanke vom Notchfilter und dem dichroitischen Spiegel abgeschnitten. Den korrekten Wert für die Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs erhält man nur für Spektren, bei denen dieser Übergang längerwellig als 534nm ist. Wenn nur diese Spektren (beziehungsweise Moleküle) in die statistische Auswertung eingehen, hat das zur Folge, daß erstens die Auswahl nicht repräsentativ für das Ensemble ist, und zweitens die Anzahl der ausgewerteten Daten für gesicherte Erkenntnisse nicht ausreicht. Wird ungeachtet dessen die verbleibende Menge Menge der unbeeinflussten Spektren statistisch ausgewertet, lassen sich immerhin einige exemplarische Schlüsse ziehen. In Abbildung 5.5 sind die Verteilungsfunktionen  $N(q_{n,t})$  verschiedener spektraler Parameter über 322 Spektren von 14 API-Molekülen dargestellt, deren  $0' \rightarrow 0$ -Übergang längerwellig als 534nm ist. Dabei ist

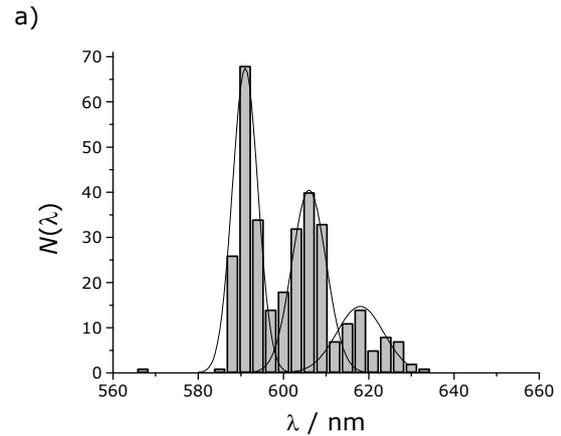
zu beachten, daß die verschiedenen Moleküle in dieser Auftragung nicht gleich, sondern proportional ihrer Beobachtungsdauer gewichtet werden, da jeweils alle Spektren eines Moleküls eingehen.

Die Verteilungsfunktionen der spektralen Schwerpunkte  $N(\lambda_{\emptyset,n,t})$  in Abbildung 5.5 (a) zeigt drei Häufungen, während die Verteilungsfunktionen der Bandenmaxima  $N(\lambda_{(\max)n,t})$  in (b) für jede der drei Schwingungsbanden einen unstrukturierten Verlauf aufweist. Das läßt den Schluß zu, daß der Ursprung der Kumulationen in Histogramm (a) in Häufungen von Eigenschaften zu suchen ist, die nicht die spektrale Lage beschreiben, sondern die Form des Spektrums (beispielsweise das Intensitätsverhältnis der Schwingungsbanden  $\Phi_{kl}$ ). Der stark erhöhte Wert bei 536nm in Histogramm (b) zeigt, daß der Einfluß von Notchfilter und dichroitischem Spiegel noch nicht gänzlich ausgeschlossen ist.

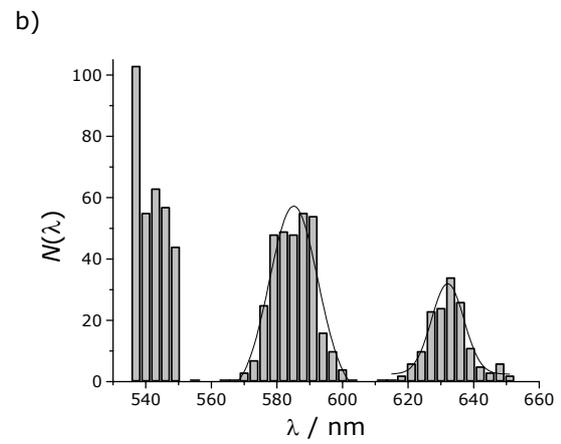
In Abbildung 5.5 (c) ist die Verteilung der energetischen Abstände zwischen den Bandenmaxima jeden einzelnen Spektrums in Wellenzahlen aufgetragen. Da diese Wellenzahlen durch die Differenzbildung aus zwei spektralen Merkmalen eines Spektrums einen intrinsischen Bezug erhalten, handelt es sich bei ihnen um Relativgrößen im Sinne von Abschnitt 2.1. Da diese Größe von der inhomogenen Verbreiterung der absoluten spektralen Positionen befreit ist, weist Histogramm (c) schmalbandigere Verteilungen auf, die nur noch die Streuung der energetischen Abstände selbst widerspiegelt. Die so ermittelten Abstände in der Schwingungsprogression können signifikant von denen abweichen, die im Ensembleexperiment am gleichen Farbstoff gewonnen werden, da der Mittelwert der Differenzen  $\langle 1/\lambda_0 - 1/\lambda_1 \rangle$  im Allgemeinen ungleich der Differenz der Mittelwerte  $\langle 1/\lambda_0 \rangle - \langle 1/\lambda_1 \rangle$  ist. Dabei sind die im dem Einzelmolekülexperiment ermittelten Werte die physikalisch korrekteren, da hier nicht die inhomogene Verbreiterung sämtlicher spektraler Merkmale eingehen, sondern nur die Streuung der beobachteten Größe.

Abbildung 5.5: Verteilungsfunktionen verschiedener spektraler Merkmale über 322 Spektren von 14 API-Molekülen.

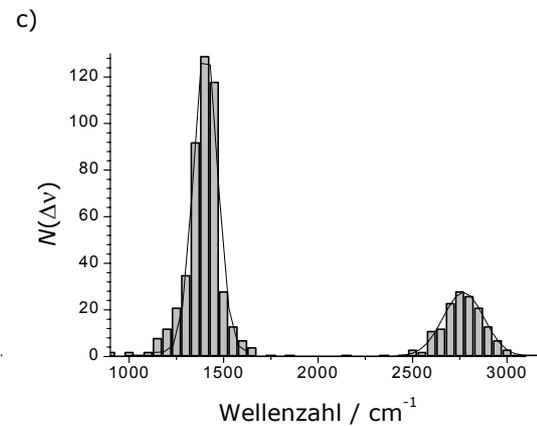
(a) Histogramm der spektralen Schwerpunkte (Schrittweite: 3nm). Deutlich ist das Auftreten von (mindestens) drei Akkumulationen bei 591, 606 und 618nm zu erkennen.



(b) Histogramm der spektralen Positionen der Bandenmaxima (Schrittweite: 3nm). Die zu den einzelnen Schwingungsbanden gehörenden Verteilungen weisen keine auffällige Struktur auf. Die Halbwertsbreiten der angefitzten Gaußfunktionen betragen 308 und 492nm. Der Wert bei 536nm ist ein Artefakt.



(c) Histogramm der energetischen Abstände in der Schwingungsprogression (Schrittweite: 50cm<sup>-1</sup>). Die erste Häufung stammt von den 0'→1- und 1'→2-Abständen, die Zweite vom 0'→2-Abstand. Die Halbwertsbreiten der angefitzten Gaußfunktionen betragen 152 und 255cm<sup>-1</sup>.



Wegen der zuvor beschriebenen Einschränkungen der mit  $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$  aufgenommenen Daten für die statistische Analyse und die Beschreibung der spektralen Dynamik, wurde für die nachfolgenden Meßreihen der Aufbau mit Fasereinkopplung und einer Anregungswellenlänge von 488nm verwendet. Allerdings wird die „in-resonance“-Form von API bei 488nm nicht mehr wesentlich angeregt. Aus diesem Grund wurde von einer detaillierten statistischen Auswertung im Falle von API abgesehen.

### 5.1.1 Zusammenfassung

Im vorliegenden Kapitel wurden die Erkenntnisse beschrieben, die bei der Untersuchung einzelner API- und DAPI-Moleküle mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$  gewonnen wurden. Dabei wurde der Zerfall des API-Ensembles in zwei wesentliche Subensembles festgestellt, die den durch die in Kapitel 4 beschriebenen Ensembleexperimente bereits aufgeklärten „in-resonance“- und „off-resonance“-Konformeren zugeordnet werden konnten. Auf Einzelmolekülebene wurden im Gegensatz zu den realen Populationen überwiegend „off-resonance“-Konformere aufgefunden. Dies ist eine Folge der Verknüpfung von Zuordnungskriterium (Lage und Form des Fluoreszenzspektrums) und subjektivem Auswahlkriterium (beispielsweise durch die leichtere Auffindbarkeit von Molekülen mit hoher Fluoreszenzquantenausbeute, siehe Abschnitt 2.4.2). Darüberhinaus konnten Übergänge zwischen den Konformationen von API als Sprünge in den spektralen Sequenzen mehrerer Moleküle direkt beobachtet werden. Als wiederholt auftretendes Phänomen ist dieser Übergang zwischen den Phänotypen der Subensembles ein typisches Beispiel intrinsischer Dynamik.

Bei beiden Farbstoffen wurde eine große Vielfalt spektraler Dynamik gefunden und in Trajektorien der wichtigsten Parameter dargestellt. Die Ausprägung dieser Prozesse wurde in den Begriffen der in Abschnitt 2.3 eingeführten Klassifikation beschrieben.

Die Unterschiede zwischen absoluten ( $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\lambda_{\text{0}}$ ) und den relativen Größen ( $\Delta\nu_{\text{kl}}$ ) der einzelnen Spektren wurden anhand der Verteilungsfunktionen dieser Parameter verdeutlicht.

Wegen des durch die Detektionsoptik bedingten Artefakts sind die mit der Direkteinkopplung und  $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$  aufgenommenen Spektren nicht zur statistischen Auswertung geeignet. Deswegen bestand die Notwendigkeit zur Aufnahme weiterer spektraler Sequenzen mit  $\lambda_{\text{EX}} = 488\text{nm}$ .

## 5.2 Experimente mit $\lambda_{\text{EX}} = 488 \text{ nm}$

Wie unter 5.1 gezeigt wurde, sind die mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{EX}} = 514 \text{ nm}$  aufgenommenen Spektrenserien nicht zur statistischen Ermittlung spezifischer Eigenschaften des Farbstoff/Matrix-Systems geeignet, da ein großer Teil der Spektren durch den Filtersatz des Mikroskops verfälscht ist. Bezöge man alle Spektren in die Analyse ein, so würden die Fehlerhaften das Ergebnis beeinflussen. Würden dagegen nur die fehlerfreien Spektren einfließen, wäre das Ergebnis nicht mehr repräsentativ für das Ensemble, da diese Spektren allesamt zum langwelligen Teil des inhomogenen Profils gehören.

Mit dem Wechsel der Anregungswellenlänge auf  $\lambda_{\text{EX}} = 488 \text{ nm}$  wurde der Einfluß des Filtersatzes auf die Meßergebnisse beseitigt. Die so gewonnenen Spektren gehen nun ohne Vorauswahl in die Untersuchungen ein. Dadurch nimmt der Umfang dieser Auswertungen erheblich zu, und eine representative Auswahl von Molekülen ist möglich.

Daher ist eine detaillierte statistische Auswertung in diesem Fall sinnvoll, wobei nach Möglichkeit spezifische, reproduzierbare Erkenntnisse über das untersuchte Farbstoff/Matrix-System erreicht werden sollen. Ist das, wie insbesondere bei der Untersuchung von seltenen oder einmaligen dynamischen Phänomenen, nicht möglich, lassen sich dennoch oft exemplarische Fallstudien durchführen.

### 5.2.1 Vergleich von Summen- und Ensemblespektrum

Zur Überprüfung der Repräsentativität der vorliegenden Daten sollen der gemittelte Einzelmolekülwert und der Ensemblewert einer Größe mit arithmetischer Korrespondenz nach Abschnitt 2.1 miteinander verglichen werden. Hierzu bietet sich das Fluoreszenzspektrum  $I(\lambda)$  direkt an.

Zur Bildung des Summenspektrums aus den Beiträgen der einzelnen Moleküle wurden alle Fluoreszenzspektren einer molekularen Sequenz zu einem molekularen Durchschnittsspektrum gemittelt. Damit geht jedes Molekül mit dem gleichen Gewicht in das Resultat ein. Die Summe dieser molekularen Durchschnittsspektren wird gebildet und mit dem Fluoreszenzspektrum des Ensembles unter möglichst identischen Bedingungen verglichen. Dazu wird eine konzentrierte ( $\sim 10^{-3} \text{ M}$ ) Lösung des jeweiligen Farbstoffs in Toluol mit 40g/l Polystyrol durch Spincoating

bei geringer Drehzahl auf einen Objektträger aufgetragen. Die entstehenden Filme weisen eine Dicke von einigen Mikrometern auf. Die Messung der Ensemblefluoreszenzspektren erfolgt am Varian Cary Eclipse. Die Anzahl der in der Summenbildung berücksichtigten Moleküle  $N$  beträgt 76 für PI, 133 für DAPI und 85 für  $\text{PIBr}_3$ . Unter Abbildung 5.6 sind jeweils Summen- und Ensemblespektrum für (a) PI, (b) DAPI und (c)  $\text{PIBr}_3$  dargestellt.

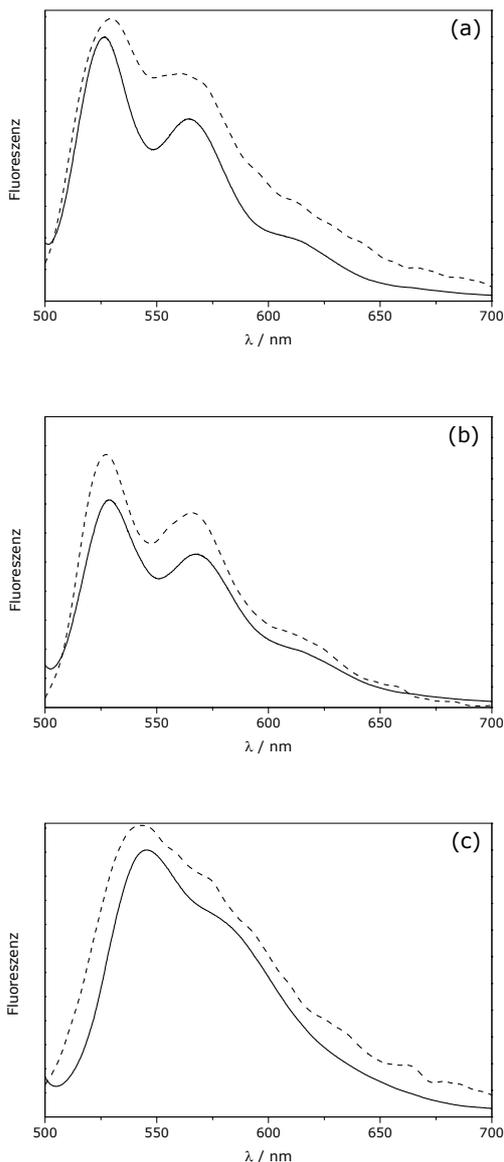


Abbildung 5.6: Summen- (unterbrochene Linie) und Ensemblespektren (durchgezogene Linie) der untersuchten Farbstoffe in Polystyrolfilmen. Die Anregungswellenlänge war 488nm. (a) PI: Gute Übereinstimmung der Maximalagen und Spektrenformen, jedoch ist die Auflösung der Bandenstruktur im Fall des Summenspektrums deutlich geringer. (b) DAPI: Gute Übereinstimmung der Spektrenformen und der Auflösung der Bandenstruktur, aber eine leichte kurzwellige Verschiebung des gesamten Summenspektrums. (c)  $\text{PIBr}_3$ : Wiederum gute Übereinstimmung von Lage und Form der Spektren, während die spektrale Breite des Summenspektrums größer ist als die des Ensemblespektrums.

Bereits eine qualitative Betrachtung zeigt eine große Ähnlichkeit zwischen den Summen- und Ensemblespektren der jeweiligen Farbstoffe. Die Auswertung der Schwingungsstrukturen analog der Beschreibung unter 4.2 ist in Tabelle 5-1 dargestellt.

System		$\lambda_0$ / nm	$\lambda_1$ / nm	$\lambda_2$ / nm
PI in PS <sup>GF</sup>	$I(\lambda)$	525,4	564,2	609,5
	$(1/N)\Sigma I(\lambda)$	524,7	559,8	606,1
DAPI in PS <sup>GF</sup>	$I(\lambda)$	528,0	566,8	612,1
	$(1/N)\Sigma I(\lambda)$	525,5	563,8	611,9
PIBr <sub>3</sub> PS <sup>GF</sup>	$I(\lambda)$	540,0	573,3	623,4
	$(1/N)\Sigma I(\lambda)$	535,9	570,7	612,4

Tabelle 5-1: Maximalagen der Schwingungsbanden, ermittelt durch Anfitzen von Gaußfunktionen.

Im Rahmen der Annahme gaußförmiger Schwingungsbanden zeigen die Werte aus Tabelle 5-1 eine brauchbare Übereinstimmung zwischen Summen- und Ensemblespektrum. Unter Berücksichtigung der Unterschiede bei der Präparation der Ensemble- und Einzelmolekülproben, wie Filmdicke und Farbstoffkonzentration, und der unterschiedlichen experimentellen Anordnung für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren, ist die Übereinstimmung der Summen- und Ensemblespektren ausreichend hoch, um für alle drei Farbstoffe eine annähernd repräsentative Auswahl an Molekülen annehmen zu können.

Bei der Durchsicht der Einzelmolekülspektren fällt auf, daß die Qualität der Spektren bei PIBr<sub>3</sub> deutlich gegenüber PI und DAPI abfällt. Dazu trägt sowohl das geringe Signal/Rauschverhältnis, als auch die ohnehin schlechte Auflösung der Schwingungsprogression der PIBr<sub>3</sub>-Spektren bei. Daher sind viele der bei PI und DAPI angewandten Auswertungen bei PIBr<sub>3</sub> nicht sinnvoll, da die Ergebnisse entweder sehr ungenau oder gar nicht zugänglich sind.

### 5.2.2 Die Verteilungsfunktionen der spektralen Parameter

Die Untersuchung der Verteilungsfunktionen der spektralen Parameter dient vor allem dem Auffinden von Subensembeln und der Beschreibung der spektralen Kriterien, denen die Zuordnung in diese Subensemble zugrunde liegt. So wäre das Auftreten von Subensembeln mit voneinander abweichenden Verhältnissen der Bandenintensitäten  $\Phi_{01}$  denkbar, die jedoch hinsichtlich der Wellenlänge ihrer Bandenmaxima nicht unterscheidbar sind. Gemäß 2.3.2.2 wäre eine solche

Subensemblebildung durch eine bimodale Verteilung der isoenergetischen Versetzung  $\Delta u$  erklärbar. Sind die auftretenden Subensemble quantitativ beschrieben, ist es bei der Untersuchung spektraler Dynamik möglich, intrinsische Sprungprozesse Übergängen zwischen den die Subensemble hervorrufenden Zuständen zuzuordnen.

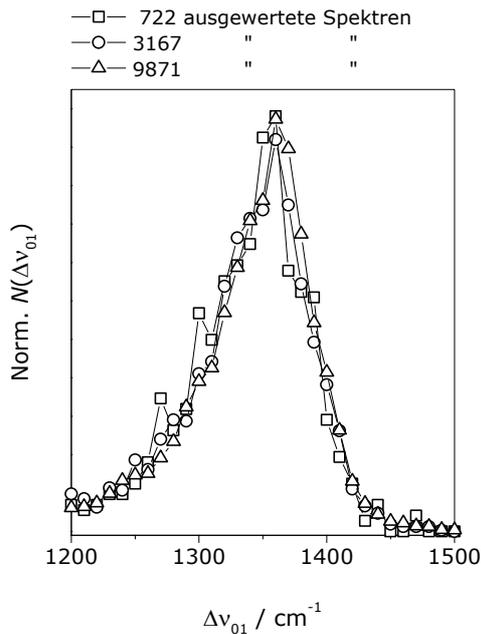


Abbildung 5.7: Die Verteilungsfunktion von  $\Delta v_{01}$  für PI in Abhängigkeit von der Zahl der berücksichtigten Spektren pro Molekül ( $N = 1000, 50, 10$ ), auf die Zahl der ausgewerteten Spektren normiert. Mit wachsendem  $N$  sinkt das Ausmaß statistischer Schwankungen, die grundsätzliche Form der Verteilung bleibt erhalten. Der spektrale Parameter  $\Delta v_{01}$  ist daher nicht mit der photochemischen Lebensdauer verknüpft (siehe Text).

Im Gegensatz zu der Informationsvielfalt der Verteilungsfunktion von Einzelmolekülparametern liefert das analoge Ensembleexperiment für jeden Parameter nur einen, jedoch in hohem Maße repräsentativen Meßwert. Um eine repräsentative Verteilungsfunktion zu erhalten, sollte einerseits die Zahl der berücksichtigten Spektren und Moleküle möglichst hoch sein, andererseits die untersuchten Moleküle mit gleichem Gewicht eingehen (siehe Abbildung 5.7). In der vorliegenden Studie zeigen die untersuchten Moleküle eine große Streuung der photochemischen Lebensdauer, und damit auch der Zahl der aufgenommenen Spektren vor dem irreversiblen Ausbleichen pro Molekül. Die durchschnittliche Zahl von Spektren, die an einem DAPI-Molekül vor dessen Photozerstörung gewonnen werden, liegt unter den Versuchsbedingungen bei über 150. In die im folgenden gezeigten Histogramme wurden die ersten 100 Spektren der molekularen Sequenzen aufgenommen. Damit fließen jeweils mehrere tausend Spektren in die Verteilungsfunktionen ein. Statistische Schwankungen spielen daher

im Histogramm nur noch eine untergeordnete Rolle. Auf der anderen Seite ist gewährleistet, daß die Gleichgewichtung der einzelnen Moleküle nicht erheblich gestört ist. Nur Moleküle, die vor der Aufnahme des 100. Fluoreszenzspektrums photozerstört wurden, sind in der Auswertung untergewichtet. Sind die untersuchten spektralen Parameter nicht mit der photochemischen Lebensdauer korreliert, sollten die Verteilungsfunktionen ausreichend repräsentativ und spezifisch sein.

### 5.2.2.1 Verteilungsfunktionen von PI

Zuerst sollen die Verteilungsfunktionen  $N(q)$  aller protokollierten spektralen Parameter für die Stammverbindung PI betrachtet werden. Bereits in der Verteilung der sehr unspezifischen Größe des spektralen Schwerpunkts sind mindestens vier Häufungen bei  $\lambda \approx 570, 576, 583, 589\text{nm}$  erkennbar (Abbildung 5.8 a). Offenbar bildet PI in PS spektrale Subensembles aus. Durch welche Parameter genau die Subensembles unterschieden werden, läßt sich aus einem Histogramm der spektralen Schwerpunkte nicht entnehmen. Die Verteilungsfunktion der Bandenmaxima ist, wie die der noch folgenden Größen, in Wellenzahlen angegeben. Das hat den Vorteil, daß Differenzen von Abszissenwerten im ganzen Histogramm vergleichbar sind. Es ist eine Vielzahl von Häufungen zu erkennen, da von jedem Fluoreszenzspektrum bis zu drei Maxima einfließen (Abbildung 5.8 b). Bandenmaxima einer Wellenzahl oberhalb von  $18500\text{cm}^{-1}$  lassen sich dem  $0' \rightarrow 0$ -Übergang zuordnen. Zwischen  $17000$  und  $18500\text{cm}^{-1}$  liegen im wesentlichen die  $0' \rightarrow 1$ -Übergänge und unterhalb  $17000\text{cm}^{-1}$  die  $0' \rightarrow 2$ -Übergänge. Jede Verteilung der einzelnen Schwingungsübergänge weist ihrerseits eine ausgeprägte Struktur mit jeweils mindestens vier Akkumulationen auf. Die absolute Lage der Spektren scheint daher ein Kriterium zur Einteilung in die Subensembles zu sein. Die Verteilung der energetischen Abstände (Abbildung 5.8 c/d) in der Schwingungsprogression ist sowohl für den Abstand zwischen erster und zweiter, als auch zwischen zweiter und dritter Fluoreszenzbande monomodal. Die Abstände sind daher nicht von der Zugehörigkeit zu bestimmten Subensembles abhängig. Die Halbwertsbreiten der Verteilungen betragen für  $\nu_{01}$   $90\text{cm}^{-1}$  und für  $\nu_{12}$   $240\text{cm}^{-1}$ , ihre Maxima liegen bei  $1360$  und  $1320\text{cm}^{-1}$ . Im Bereich geringer vibronischer Anregung liegt hier also ein relativ harmonisches Potential vor.

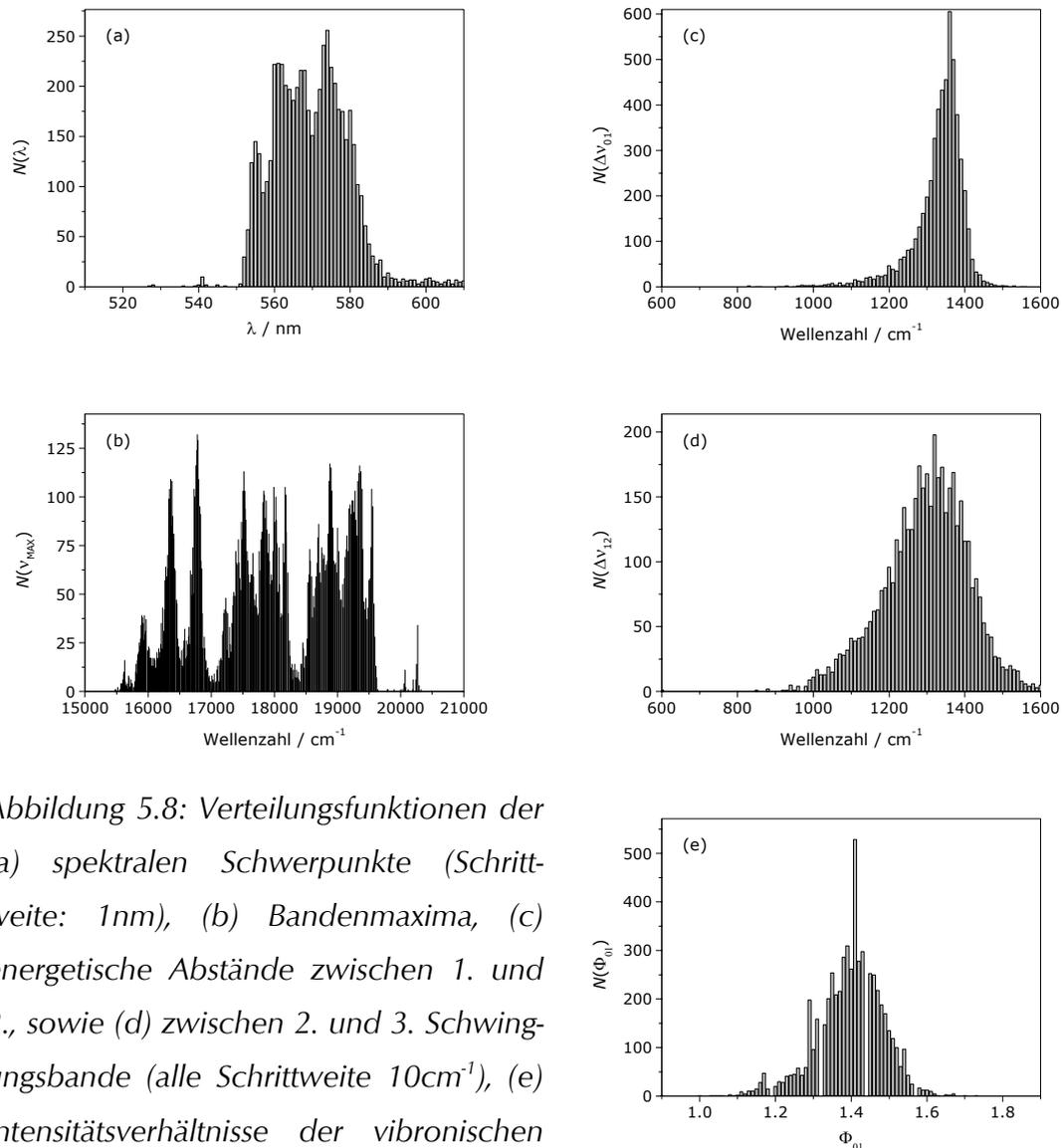


Abbildung 5.8: Verteilungsfunktionen der (a) spektralen Schwerpunkte (Schrittweite: 1nm), (b) Bandenmaxima, (c) energetische Abstände zwischen 1. und 2., sowie (d) zwischen 2. und 3. Schwingungsbande (alle Schrittweite  $10\text{cm}^{-1}$ ), (e) Intensitätsverhältnisse der vibronischen Banden (Schrittweite 0.01).

Die unter (e) äquidistant auftretenden Nullwerte werden scheinbar durch ein Artefakt bei der automatisierten Erstellung der Verteilungen für  $\Phi_{kl}$  hervorgerufen. Ensemblemessungen liefern für PI in PS folgende Werte: (a) spektraler Schwerpunkt  $\lambda = 561\text{nm}$ , (b) Bandenmaxima  $\nu_0 = 19033\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_1 = 17724\text{cm}^{-1}$  und  $\nu_2 = 16407\text{cm}^{-1}$ , (c/d) Bandenabstände  $\Delta\nu_{01} = 1309\text{cm}^{-1}$  und  $\Delta\nu_{12} = 1317\text{cm}^{-1}$ , Intensitätsverhältnis  $\Phi_{01} = 1,45$ .

Da sich die Intensitätsverhältnisse der Schwingungsbanden um den Wert 1,4 ebenfalls monomodal verteilen, bleibt die absolute spektrale Lage der einzige Parameter, auf den sich die Subensembelbildung erkennbar auswirkt. Die Moleküle

verschiedener Subensemble von PI in PS unterscheiden sich also photophysikalisch in ihrem  $S_0$ - $S_1$ -Abstand. Die Energiedifferenzen  $\Delta\nu_{kl}$  und die Intensitätsverhältnisse  $\Phi_{kl}$  der Schwingungsprogression weisen dagegen nur inhomogene Verbreiterung auf. Die Halbwertsbreite der  $\Phi_{kl}$  beträgt hier  $\sim 0,2$ .

Wird die Bildung von Subensembeln ausschließlich durch Gruppierung in der absoluten Spektrenlage verursacht, sollte die Verteilungsfunktion der spektralen Schwerpunkte und die der Bandenmaxima einer einzelnen Schwingungsbande eine hohe Ähnlichkeit aufweisen. Zur Überprüfung werden von beiden Parametern Verteilungsfunktionen mit einer Schrittweite von  $50\text{cm}^{-1}$  erzeugt (Abbildung 5.9). Diese Verteilungsfunktionen werden miteinander gekreuzkorreliert:

$$g^x(\Delta\nu) = \int N(\bar{\nu}) \cdot N(\nu_0 + \Delta\nu) d\nu \quad (5.1)$$

sowie jeweils autokorreliert ( $g^*(\Delta\nu)$ ). Bei vollständiger Korrelation müßte die Kreuzkorrelationsfunktion folgendenden Wert  $g^x(\Delta\nu)$  am Maximum bei  $1447\text{cm}^{-1}$  erreichen:

$$g^x(1447\text{cm}^{-1}) = \sqrt{g^*(\Delta\bar{\nu} = 0) \cdot g^*(\Delta\nu_{01} = 0)} = 4,96 \times 10^5 \quad (5.2)$$

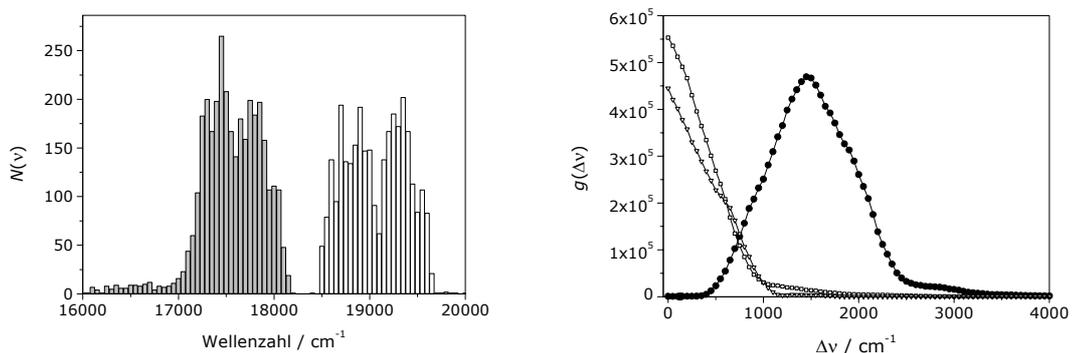


Abbildung 5.9: Die Verteilungen der spektralen Schwerpunkte und der Bandenmaxima des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs von PI in PS (beides in Wellenzahlen,  $50\text{cm}^{-1}$  Schrittweite), sowie die Korrelationsfunktionen:  $\bullet$  Kreuzkorrelation,  $\nabla$  Autokorrelation Schwerpunkte,  $\square$  Autokorrelation Maxima.

Bei  $\Delta\nu = 1447\text{cm}^{-1}$  erreicht  $g^x(\Delta\nu)$  tatsächlich  $4,69 \times 10^5$ , damit 94,6% des für vollständige Korrelation vorausgesagten Wertes (Abbildung 5.9). Die vermutete Ähnlichkeit der Verteilungsfunktionen kann also bestätigt werden. Die Häufungen in der Verteilung der spektralen Schwerpunkte bei PI in PS erklären sich daher hinreichend durch die Gruppierung der absoluten spektralen Lagen.

### 5.2.2.2 Verteilungsfunktionen von DAPI

Auch im Falle von DAPI zeigt sich bereits in der Verteilungsfunktion der spektralen Schwerpunkte eine deutliche Struktur. Dabei weist das Histogramm um 565nm ein dominierendes absolutes Maximum auf, auf beiden Seiten umgeben von jeweils zwei nach außen niedriger werdenden Häufungen (Abbildung 5.10 a). Auch bei diesem Farbstoff ist also der Zerfall des Ensembles in Subensemble festzustellen. Die Darstellung und Analyse der Verteilungsfunktion der anderen spektralen Größen erfolgt analog dem Vorgehen bei PI. In den Histogrammen der Bandenmaxima einzelner Schwingungsbanden sind ebenfalls Häufungen deutlich erkennbar (Abbildung 5.10 b). In der isolierten Verteilungsfunktion der  $0' \rightarrow 2$ -Schwingungsbande sind vier Akkumulationen eindeutig zu identifizieren, eine Fünfte bei  $17000\text{cm}^{-1}$  nicht auszuschließen. Eine genaue Analyse der  $0' \rightarrow 0$ - und  $0' \rightarrow 1$ -Bande in einzelne Akkumulationen ist nicht möglich. Wie bei PI ergeben sich für die Histogramme der Abstände in der Schwingungsprogression bei DAPI jeweils monomodale Verteilungen um  $\Delta\nu_{01} = 1338\text{cm}^{-1}$  und  $\Delta\nu_{12} = 1301\text{cm}^{-1}$  (Abbildung 5.10 c/d). Ihre Halbwertsbreiten betragen  $90\text{cm}^{-1}$ , respektive  $230\text{cm}^{-1}$ . Für das Bandenintensitätsverhältnis erhält man ebenfalls eine monomodale, jedoch stark unsymmetrische Verteilung mit dem Maximum bei  $\Phi_{01} = 1,36$  (Abbildung 5.10 e).

Auch für DAPI bleibt also zur Erklärung des Auftretens von Subensembeln, das sich in der Verteilung der spektralen Schwerpunkte bereits abzeichnet, nur die Gruppierung der absoluten Lage der Fluoreszenzspektren und damit der  $S_0$ - $S_1$ -Abstände der Moleküle. Die übrigen Parameter, die die Form der Spektren beschreiben, sind wie im Fall von PI lediglich der inhomogenen Verbreiterung unterworfen.

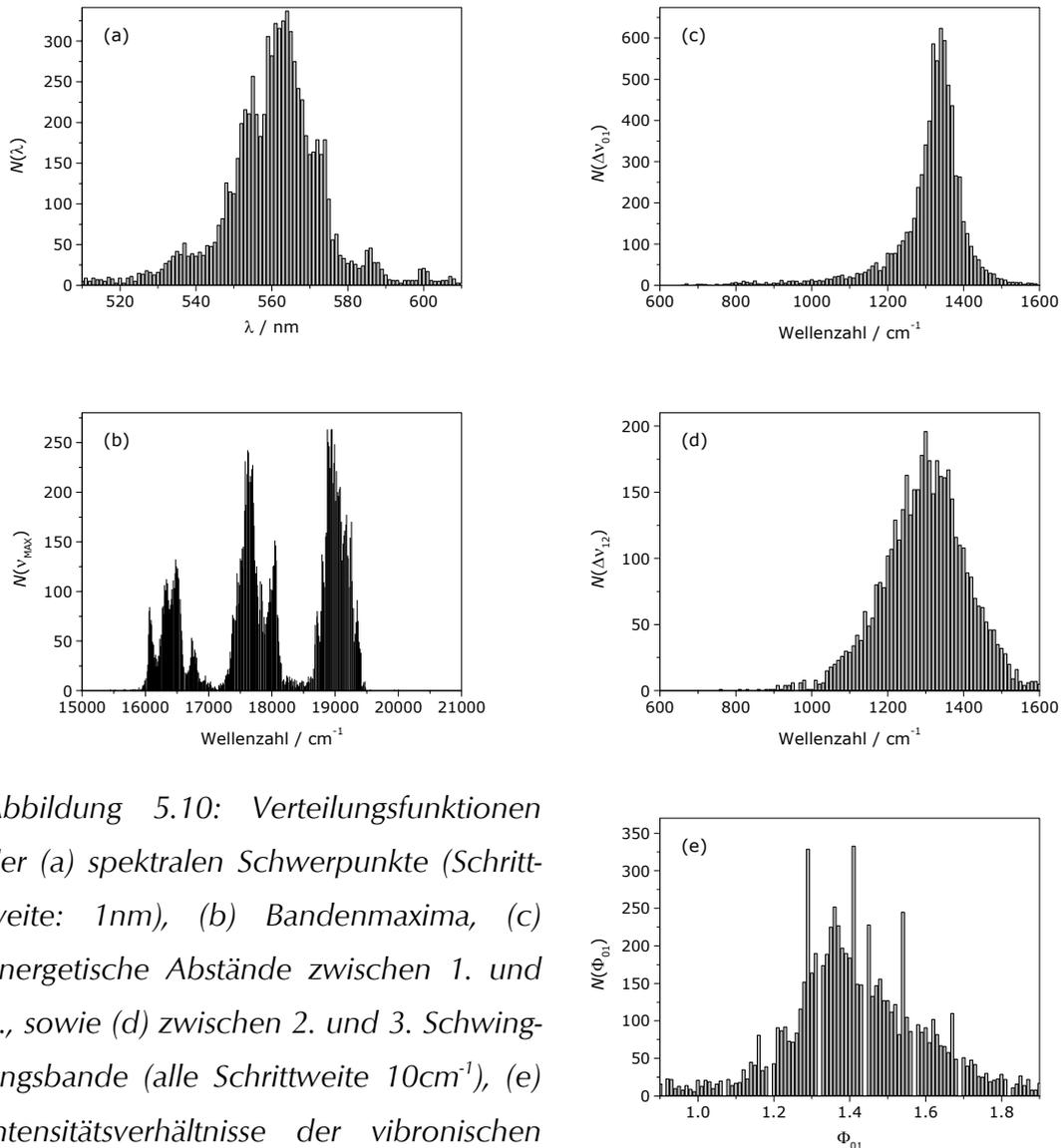


Abbildung 5.10: Verteilungsfunktionen der (a) spektralen Schwerpunkte (Schrittweite: 1nm), (b) Bandenmaxima, (c) energetische Abstände zwischen 1. und 2., sowie (d) zwischen 2. und 3. Schwingungsbande (alle Schrittweite  $10\text{cm}^{-1}$ ), (e) Intensitätsverhältnisse der vibronischen Banden (Schrittweite 0.01).

Die unter (e) äquidistant auftretenden Nullwerte werden scheinbar durch ein Artefakt bei der automatisierten Erstellung der Verteilungen für  $\Phi_{ki}$  hervorgerufen. Ensemblesmessungen liefern für DAPI in PS folgende Werte: (a) spektraler Schwerpunkt  $\lambda = 565\text{nm}$ , (b) Bandenmaxima  $\nu_0 = 18939\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_1 = 17643\text{cm}^{-1}$  und  $\nu_2 = 16337\text{cm}^{-1}$ , (c/d) Bandenabstände  $\Delta\nu_{01} = 1296\text{cm}^{-1}$  und  $\Delta\nu_{12} = 1306\text{cm}^{-1}$ , Intensitätsverhältnis  $\Phi_{01} = 1,33$ .

Wie für PI, soll auch für DAPI ein Vergleich der Verteilungsfunktionen der spektralen Schwerpunkte und der Bandenmaxima des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs per Korrelationstest durchgeführt werden.

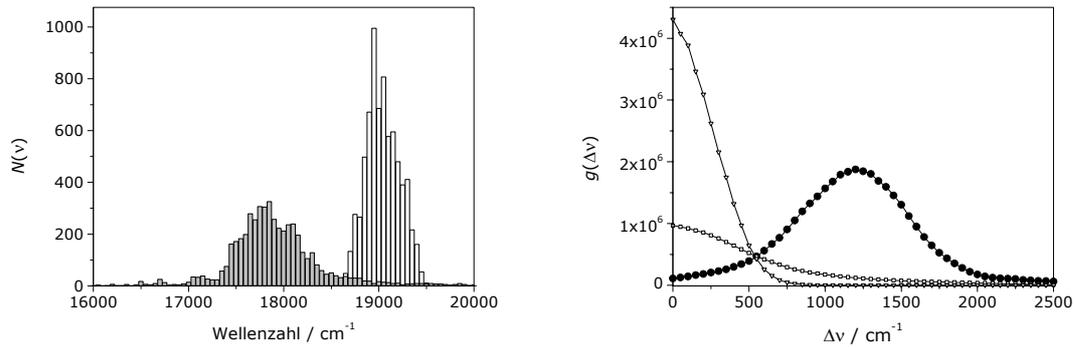


Abbildung 5.11: Die Verteilungen der spektralen Schwerpunkte und der Bandenmaxima des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs für DAPI in PS (beides in Wellenzahlen,  $50\text{cm}^{-1}$  Schrittweite), sowie die Korrelationsfunktionen: ● Kreuzkorrelation, ▽ Autokorrelation Schwerpunkte, ◻ Autokorrelation Maxima.

Der Vergleich der Korrelationsfunktionen zeigt, daß die Kreuzkorrelationsfunktion bei  $\Delta\nu = 1202\text{cm}^{-1}$  fast den Wert  $1,9 \times 10^6$  erreicht. Bei vollständiger Korrelation müßte die Kreuzkorrelationsfunktion  $g^x(\Delta\nu)$  am Maximum den Wert

$$g^x(1202\text{cm}^{-1}) = \sqrt{g^*(\Delta\nu = 0) \cdot g^*(\Delta\nu_{01} = 0)} = 2,04 \times 10^6 \quad (5.3)$$

annehmen. Bei  $\Delta\nu = 1202\text{cm}^{-1}$  erreicht  $g^x(\Delta\nu)$  also 91,8% des für vollständige Korrelation vorausgesagten Wertes. Die vermutete Ähnlichkeit der Verteilungsfunktionen kann also wiederum bestätigt werden. Die Häufungen in der Verteilung der spektralen Schwerpunkte erklären sich daher auch bei DAPI hinreichend durch die Gruppierung der absoluten spektralen Lagen.

### 5.2.2.3 Verteilungsfunktionen von PIBr<sub>3</sub>

Die Fluoreszenz von PIBr<sub>3</sub>-Molekülen weist gegenüber der von PI und DAPI wegen der geringen Fluoreszenzquanteneffizienz ein wesentlich schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis auf. Die vibronische Progression ist bei PIBr<sub>3</sub> von vorn herein deutlich schlechter aufgelöst als bei den anderen untersuchten Farbstoffen. Zudem führt die niedrige photochemische Lebensdauer zu einer relativ geringen

Zahl von Spektren pro Molekül. Aus diesen Gründen ist es bei  $\text{PIBr}_3$  nicht vermeidbar, in großem Umfang systematische und statistische Fehler in die Studie mit einzubeziehen, so daß nur wenige sichere Aussagen möglich sind.

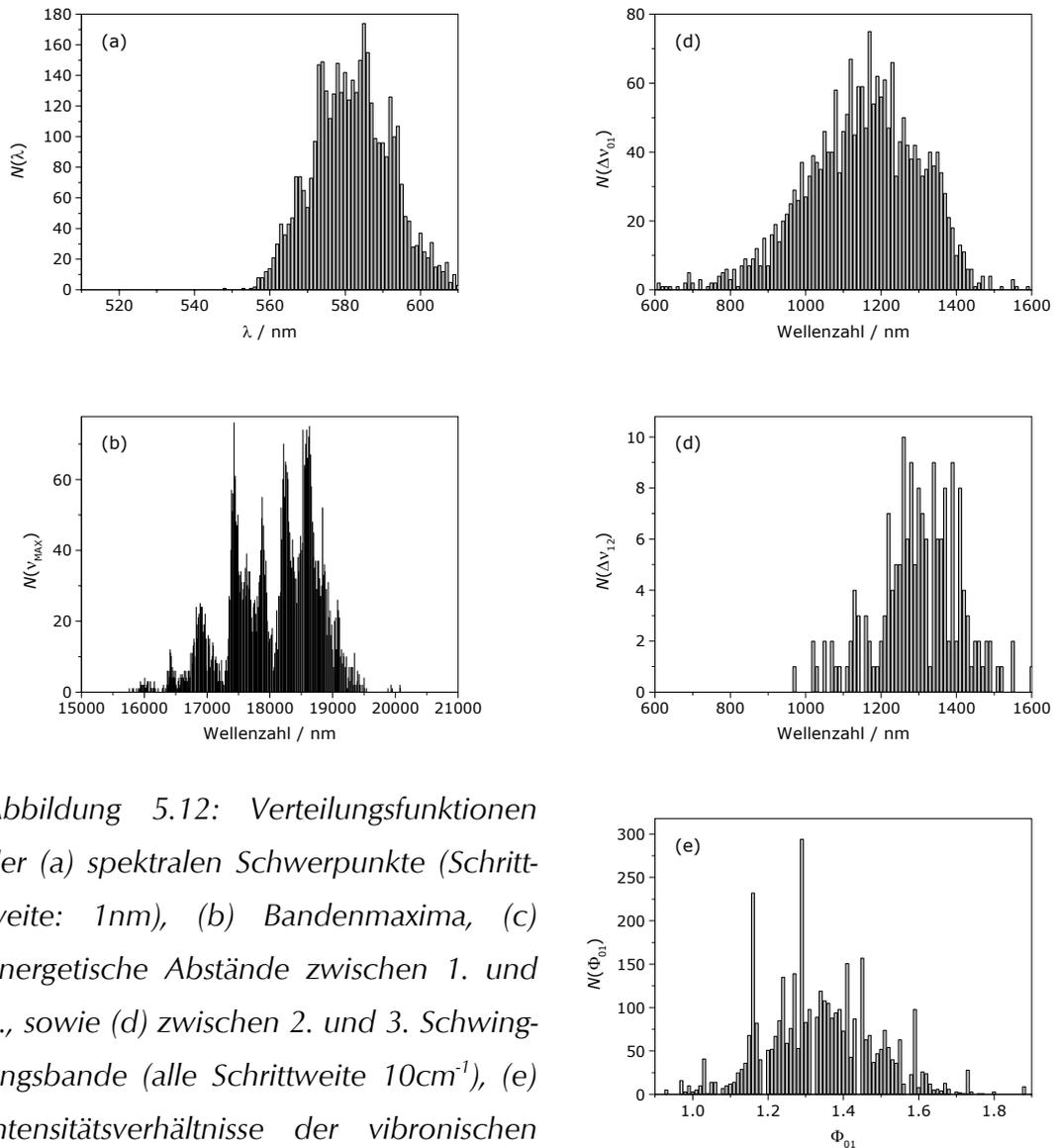


Abbildung 5.12: Verteilungsfunktionen der (a) spektralen Schwerpunkte (Schrittweite: 1nm), (b) Bandenmaxima, (c) energetische Abstände zwischen 1. und 2., sowie (d) zwischen 2. und 3. Schwingungsbande (alle Schrittweite  $10\text{cm}^{-1}$ ), (e) Intensitätsverhältnisse der vibronischen Banden (Schrittweite 0.01).

Die unter (e) äquidistant auftretenden Nullwerte werden scheinbar durch ein Artefakt bei der automatisierten Erstellung der Verteilungen für  $\Phi_{ki}$  hervorgerufen. Ensemblesmessungen liefern für  $\text{PIBr}_3$  in PS folgende Werte: (a) spektraler Schwerpunkt  $\lambda = 574\text{nm}$ , (b) Bandenmaxima  $\nu_0 = 18450\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_1 = 17036\text{cm}^{-1}$ , (c/d) Bandenabstände  $\Delta\nu_{01} = 1414\text{cm}^{-1}$ .

Offensichtlich ist eine Gruppierung der spektralen Lagen der Bandenmaxima. Die Anzahl von Häufungen je Schwingungsübergang ist dagegen schwer abzuschätzen. Auch die Verteilung der spektralen Schwerpunkte ist folglich nicht monomodal, aber auch hier lassen sich statistische Schwankungen kaum von physikalischen Phänomenen abgrenzen. Die Histogramme der Abstände in der Progression, sowie der Intensitätsverhältnisse der Schwingungsbanden erlauben nahezu keine Interpretation. Das der Abstand zwischen den Banden des  $0' \rightarrow 0$ - und des  $0' \rightarrow 1$ -Übergangs mit einer Halbwertsbreite von  $370\text{cm}^{-1}$  sehr stark gestreut ist und dazu mit  $1180\text{cm}^{-1}$  am Maximum der Verteilung recht gering ausfällt, könnte an der gegenseitigen Beeinflussung dieser Banden aufgrund ihrer großen spektralen Breite liegen.

#### 5.2.2.4 Vergleich zwischen den Farbstoffen

Zum direkten Vergleich der Verteilungsfunktionen verschiedener Farbstoffe werden nur PI und DAPI herangezogen. Gegenüber diesen Farbstoffen fällt die Qualität der Histogramme des  $\text{PIBr}_3$  zu stark ab, um sinnvolle Vergleiche anstellen zu können.

Gemeinsam ist beiden Farbstoffen die monomodale, schmale Verteilung der Abstände zwischen den Schwingungsbanden  $\Delta\nu_{01}$  und  $\Delta\nu_{12}$ . Die deutlich höhere Halbwertsbreite der  $\Delta\nu_{12}$  bei beiden Farbstoffen wird durch das geringere Signal/Rausch-Verhältnis der langwelligeren Schwingungsbanden verursacht, die im Vergleich zur  $0' \rightarrow 0$ -Bande deutlich geringere Intensitäten zeigen. Tabelle 5-2 stellt die Meßwerte beider Farbstoffe noch einmal gegenüber.

Meßgröße	Verteilungsparameter	PI	DAPI
$\Delta\nu_{01}$	Maximum	$1360\text{cm}^{-1}$	$1338\text{cm}^{-1}$
	Halbwertsbreite	$90\text{cm}^{-1}$	$90\text{cm}^{-1}$
$\Delta\nu_{12}$	Maximum	$1320\text{cm}^{-1}$	$1301\text{cm}^{-1}$
	Halbwertsbreite	$240\text{cm}^{-1}$	$230\text{cm}^{-1}$

Tabelle 5-2: Gegenüberstellung der Verteilungsparameter für die Schwingungsbandenabstände von PI und DAPI.

Die Verteilungsfunktionen der beiden Farbstoffe über den Quotienten der Bandenintensitäten  $\Phi_{01}$  zeigen bei vergleichbaren Werten ihr Maximum, 1,40 bei PI und 1,36 bei DAPI. Zwar sind beide Verteilungen monomodal, während sie sich im Fall von PI jedoch symmetrisch mit einer Halbwertsbreite von 0,2 um das Maximum anordnet, zeigt die Verteilung für DAPI unsymmetrisches Verhalten bei einer Halbwertsbreite von 0,3. Zu hohen Werten hin fällt die Verteilungsfunktion wesentlich flacher ab als zu niedrigen Werten. Im Gegensatz zu PI zeigt DAPI noch Meßwerte über  $\Phi_{01} > 1,7$ .

Gegenüber den vernachlässigbaren Abweichungen zwischen den Farbstoffen bei den Verteilungsfunktionen der Relativgrößen  $\Delta\nu_{01}$ ,  $\Delta\nu_{12}$  und  $\Phi_{01}$ , sind die absoluten Lagen der Bandenmaxima  $\nu_{\max}$  bei PI und DAPI signifikant unterschiedlich verteilt. Während bei PI eine intensive Gruppierung der Bandenmaxima über einen weiten Bereich zu beobachten ist (Abbildung 5.8 b), liegen die Häufungen bei DAPI sehr dicht und fallen vom Maximum schnell nach außen ab (Abbildung 5.10 b). Dies spiegelt sich natürlich auch im Histogramm der spektralen Schwerpunkte wider.

Bei den Maximalagen  $\nu_{\max}$  muß innerhalb eines Histogramms ein Zusammenhang zwischen den Verteilungen der einzelnen Schwingungsbanden bestehen, da ja die Abstände  $\Delta\nu_{kl}$  zwischen diesen Banden nicht zu Subensembeln gruppiert, sondern sehr schmalbandig und monomodal verteilt sind. Aus diesem Grund sollen die Verteilungsfunktionen beider Farbstoffe auf Regelmäßigkeiten in der Abfolge und auf wiederkehrende Distanzen zwischen den Häufungen untersucht werden. Hierzu bieten sich die Autokorrelationsfunktionen

$$g^*(\Delta\nu) = \int N(\nu_{\max}) \cdot N(\nu_{\max} + \Delta\nu) d\nu \quad (5.4)$$

an. Es werden die zuvor gezeigten Datensätze mit einer Schrittweite von  $10\text{cm}^{-1}$  benutzt. Die so erzeugten Autokorrelationsfunktionen sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Der Unterschied zwischen den Farbstoffen ist offensichtlich. Bei DAPI wird einzig die Periodizität der vibronischen Progression in drei Korrelationsmaxima bei  $\Delta\nu = 0, 1299$  und  $2598\text{cm}^{-1}$  sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigt die Autokorrelationsfunktion von PI eine Vielzahl von Maxima. Dabei ist zunächst festzustellen, daß die Abfolge der zugehörigen Verschiebungen  $\Delta\nu$

wiederum eine Regelmäßigkeit ausweist: Die Abstände zwischen den  $\Delta\nu$  der einzelnen Maxima scheinen sich für jede Schwingungsbande zu wiederholen. Die Abfolge der Korrelationsmaxima wurde durch die Annahme von vier Subensembeln interpretiert, die die Verteilungen aller vibronischen Übergänge aufspaltet. Ein mögliches Schema ist in Tabelle 5-3 und Abbildung 5.14 dargestellt.

Abbildung 5.13: Die normierten Autokorrelationsfunktionen der Verteilungen über die Lage der Bandenmaxima. Während bei DAPI nur die Periodizität der Schwingungsprogression in Erscheinung tritt, sind bei PI zusätzliche Korrelationsmaxima zu verzeichnen.

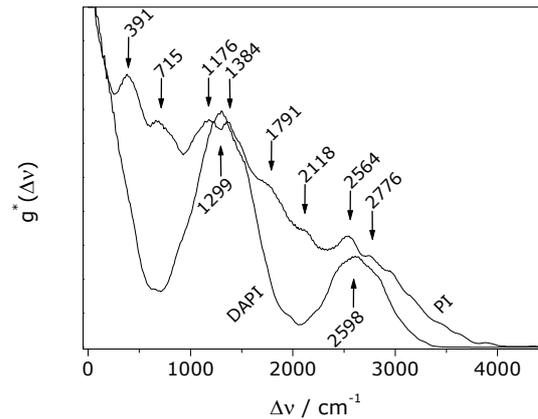
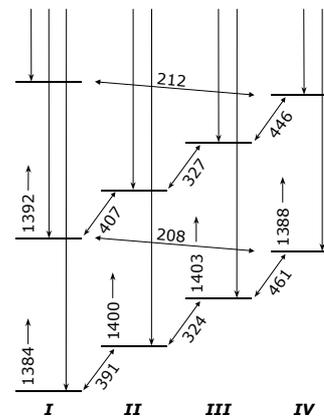


Abbildung 5.14: Denkbare Übergangs- und Zustandsschema des Grundzustands von PI in PS nach der Interpretation der Autokorrelationsfunktion. Die absoluten spektralen Lagen der vier Subensemble liegen demnach  $\sim 400$ ,  $\sim 325$ , und  $\sim 445\text{cm}^{-1}$  auseinander, die Abstände in der Schwingungsprogression bei ungefähr  $1390\text{cm}^{-1}$ .



	0	391	715	1176	1384	1791	2118	2564	2776
Diff.		391	324	461	208	407	327	446	212
Vib	$0' \rightarrow 0$	$0' \rightarrow 0$	$0' \rightarrow 0$	$(0' \rightarrow 0)$ IV	$0' \rightarrow 1$	$0' \rightarrow 1$	$0' \rightarrow 1$	$0' \rightarrow 1$	$(0' \rightarrow 1)$ IV
Sub	I $\rightarrow$ II	II $\rightarrow$ III	III $\rightarrow$ IV	$\rightarrow (0' \rightarrow 0)$ I	I $\rightarrow$ II	II $\rightarrow$ III	III $\rightarrow$ IV	$\rightarrow (0' \rightarrow 2)$ I	

Tabelle 5-3: Differenzen und mögliche Zuordnungen der Maxima in der Autokorrelationsfunktion von PI in PS. Die römischen Zahlen bezeichnen die Subensemble. Alle Werte sind in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben.

Die dargestellte Interpretation deckt sich mit vielen bisherigen Erkenntnissen über PI in PS. Eine Unzulänglichkeit des Modells ist jedoch der Vergleich mit der Verteilungsfunktion der Maximalagen. Die äußeren Akkumulationen der einzelnen Schwingungsbanden kommen sich hier nicht auf  $\sim 200\text{cm}^{-1}$  nahe, wie das Modell voraussagt. Ein Problem bei der Verteilungsfunktion der Maximalagen ist, daß nicht von jedem Spektrum drei Maxima eingehen. Insbesondere der relativ wenig intensive  $0' \rightarrow 2$ -Übergang ist untervertreten. Das dürfte ein Grund dafür sein, daß für diesen Übergang nur vier Häufungen klar erkennbar sind, während bei den anderen Übergängen bis zu sieben Akkumulationen als Subensemble interpretiert werden könnten.

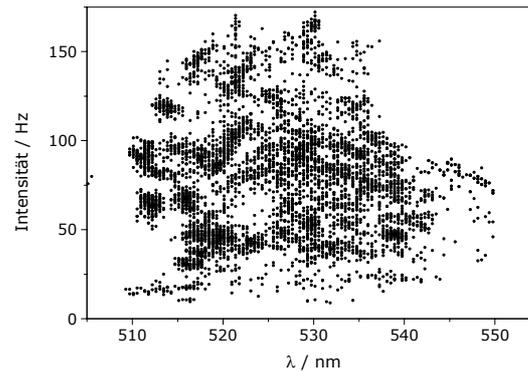
Unabhängig von der Zuordnung der Korrelationsmaxima stellen diese Werte spektrale Abstände zwischen Subensembeln dar. Werden spektrale Sprünge vom S1-Typ mit Sprungweiten beobachtet, die zu den oben ermittelten Werten passen, ist es wahrscheinlich, daß es sich um intrinsische Sprungphänomene zwischen Subensembeln mit unterschiedlicher absoluter spektraler Lage handelt.

### 5.2.3 Korrelationen zwischen den Fluoreszenzparametern

#### 5.2.3.1 Spektrale Lage / Intensität

Die Intensitätswerte verschiedener Moleküle lassen sich nicht direkt miteinander vergleichen, da sowohl die Absorption des Anregungslichts als auch die Abstrahlung der Fluoreszenz in Detektionsrichtung abhängig sind von der Orientierung der Moleküle. Die Winkel zwischen deren Übergangsdipolmomenten und der Beobachtungsrichtung sind statistisch verteilt und aus dem Fluoreszenzspektrum eines Moleküls nicht zugänglich. Wenn aber die Vergleichbarkeit der Intensitäten zwischen den Molekülen nicht gegeben ist, lassen sich Korrelationen zu anderen Meßgrößen nicht einfach durch gegenseitiges Auftragen ermitteln (Abbildung 5.15). Da jedoch die statistische Verteilung der Orientierung von Übergangsdipolmomenten vorausgesetzt wird, und ein Zusammenhang zwischen dieser Orientierung im Polymer und den spektralen Parametern physikalisch nicht plausibel ist, lassen sich repräsentative Intensitätsmittelwerte für Intervalle eines spektralen Parameters bilden. Diese Mittelwerte können nun gegen den jeweiligen Parameter aufgetragen und auf Korrelation untersucht werden.

Abbildung 5.15: Auftragung der Intensität gegen die Wellenlänge der Maxima des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs von PI in PS. Insgesamt sind 5454 Wertepaare dargestellt. In dieser Form lassen sich Korrelationen nicht erkennen.



Die weiteste Streuung unter den spektralen Größen zeigt die absolute spektrale Lage, also die Lage der Bandenmaxima. Deshalb wird der Zusammenhang zwischen dieser Größe und der mittleren Intensität der Spektren untersucht. Dazu werden Wellenlängenintervalle gebildet. Die Meßwerte für die Intensität einer  $0' \rightarrow 0$ -Schwingungsbande werden in die Mittelung einbezogen, sofern die Maxima dieser Bande im Wellenlängenintervall liegen. Pro Intervall wird daher ein Intensitäts/Wellenlängen-Datenpaar erzeugt. Diese werden dann aufgetragen (Abbildung 5.16), wobei die Fläche der Symbole die Anzahl der eingeflossenen Spektren in diesem Intervall angibt. Wie bei der Bildung der Verteilungsfunktionen wurden die ersten hundert Spektren je Molekül benutzt.

Eine analoge Auswertung wurde für die spektralen Schwerpunkte und die Intervallmittelwerte der integralen Intensität durchgeführt. Da die übrigen Parameter, wie die Abstände in der vibronischen Progression und das Intensitätsverhältnis der Schwingungsbanden, bei beiden Farbstoffen nur inhomogen verbreitert sind, ist die Verteilung der spektralen Schwerpunkte wie gezeigt (Abschnitte 5.2.2.1 und 5.2.2.2) direkt mit der Verteilung der Bandenmaximalagen verknüpft. Daher sollten sich die Auftragungen von Intensität gegen Lage der  $0' \rightarrow 0$ -Bande und von Schwerpunkt gegen Fläche der Einzelmolekülspektren zumindest qualitativ gleichen.

Die Auftragung der mittleren Intervallintensitäten gegen die zentrale Wellenlänge der Intervalle zeigt für PI ein Minimum bei 515nm ( $19400\text{cm}^{-1}$ ). Dessen Halbwertsbreite beträgt 5,3nm ( $200\text{cm}^{-1}$ ). Ein ähnliches Minimum weist DAPI bei 530nm ( $18870\text{cm}^{-1}$ ) auf. Diese Minima lassen sich am Beispiel von PI auf verschiedene Weise erklären:

- (1) Statistische Abweichung: In die Mittelung für den (5nm-) Intervall um 517nm sind bei PI Spektren geringer Intensität übergewichtet vertreten. Dagegen spricht, daß der fragliche Datenpunkt mit 1131 einbezogenen Spektren (und damit mindestens 12 Molekülen) einer der statistisch sichersten Werte dieser Auftragung ist.
- (2) Subensemblecharakteristik: Das zu dem Intervall von 515 bis 520nm (19400 bis 19230cm<sup>-1</sup>) überwiegend beitragende Subensemble von PI weist eine deutlich geringere Fluoreszenzrate für den 0'→0-Übergang auf als die spektral benachbarten. Die Fluoreszenzrate könnte dabei durch eine verminderte Fluoreszenzquanteneffizienz oder durch einen geringeren Absorptionsquerschnitt reduziert sein. Ein deutlich abweichender Wert des Intensitätsverhältnisses  $\Phi_{01}$  des Subensembles scheidet aufgrund der monomodalen Verteilung dieser Größe als Erklärung aus (Abbildung 5.8 e).

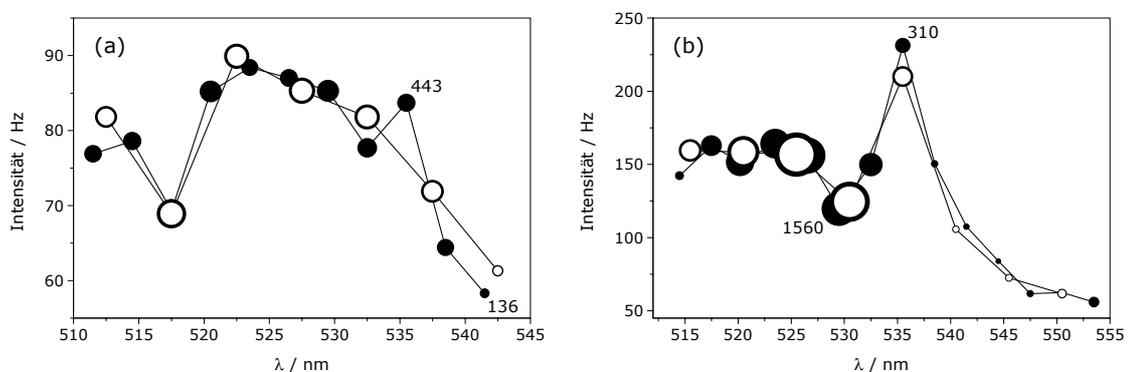


Abbildung 5.16: Gemittelte Fluoreszenzintensität als Funktion der spektralen Lage, hier angegeben durch die Intensität und die Wellenlänge des 0'→0-Bandenmaximums. Für beide Farbstoffe wurden Auswertungen mit einer Intervallbreite von 3 und 5nm durchgeführt (schwarze und weiße Symbole). Die Fläche der Symbole gibt die Anzahl der eingeflossenen Spektren an. Zum Vergleich sind einige Spektrenzahlen an den Symbolen dargestellt. (a) Die Auftragung für PI in PS zeigt ein Minimum bei ~517nm, das globale Maximum liegt bei ~523nm. (b) In der Auftragung für DAPI in PS findet sich ein Minimum bei ~530nm, das globale Maximum bei ~536nm.

(3) Abbild des Absorptionsspektrums: Variiert die Lage des Absorptionsspektrums systematisch mit der Lage des Fluoreszenzspektrums, ist die mittlere Intensität der Spektren in den Intervallen durch die mittlere Absorption der zugehörigen Absorptionsspektren an der Anregungswellenlänge bestimmt. Wäre dieser Umstand die einzige Ursache für die Abhängigkeit der mittleren Intensität von der spektralen Lage, sollte man ein, eventuell verzerrtes, spiegelbildliches Abbild des Absorptionsspektrums erhalten. Die beobachteten Minima entsprechen demnach dem Abbild des lokalen Minimums im Absorptionsspektrum zwischen der  $0' \rightarrow 0$ - und der  $0' \rightarrow 1$ -Bande. Dafür spricht, daß die Anregungswellenlänge von 488nm in dieses lokale Minimum der Ensemblespektren von PI (und DAPI) fällt. Die Verknüpfung von Intensität und spektraler Lage über das Absorptionsspektrum wurde schon früh zur Erklärung von Intensitätsveränderungen einzelner fluoreszierender Moleküle herangezogen, unter anderem von Xie [39]. Wird diese Interpretation auf Abbildung 5.16 a angewandt, muß das Intensitätsminimum der  $0' \rightarrow 0$ -Bande bei 517nm durch die Anregung der fraglichen PI-Moleküle im Absorptionsminimum zwischen dem  $0 \rightarrow 0'$ - und  $0 \rightarrow 1'$ -Übergang verursacht werden. Das Absorptionsminimum liegt bei diesen Molekülen daher bei 488nm. Der Abstand zwischen Absorptionsminimum und dem  $0' \rightarrow 0$ -Fluoreszenzbandenmaximum beträgt somit  $(517 - 488)\text{nm} = 29\text{nm}$ . Im Ensembleabsorptionsspektrum von PI liegen Absorptionsminimum und  $0 \rightarrow 0'$ -Maximum 14nm auseinander. Wird dieser Ensemblewert in die Auswertung von Abbildung 5.16 a einbezogen, führt das zu einer durchschnittlichen Stokes-Verschiebung von  $(29 - 14)\text{nm} = 15\text{nm}$  für die Moleküle des Intervalls um 517nm. Dieser Wert stimmt hervorragend mit dem Ensemblewert der Stokes-Verschiebung für PI in PS von 15,3nm überein. Dieser Befund ist ein starkes Indiz für das Zutreffen von Interpretation (3) im Fall von PI. Das Minimum bei 530nm in der Auftragung für DAPI (Abbildung 5.17 b) führt bei analoger Auswertung zu einer mittleren Stokes-Verschiebung von 28nm für die Moleküle im Intervall um 530nm. Dieser Wert weicht jedoch deutlich von dem im Ensembleexperiment bestimmten Wert ab, der 15,9nm beträgt (Tabelle 4-3). Im Fall von DAPI reicht diese Interpretation offensichtlich nicht zur Erklärung der Abhängigkeit der gemittelten Intervallintensitäten von der spektralen Lage aus.

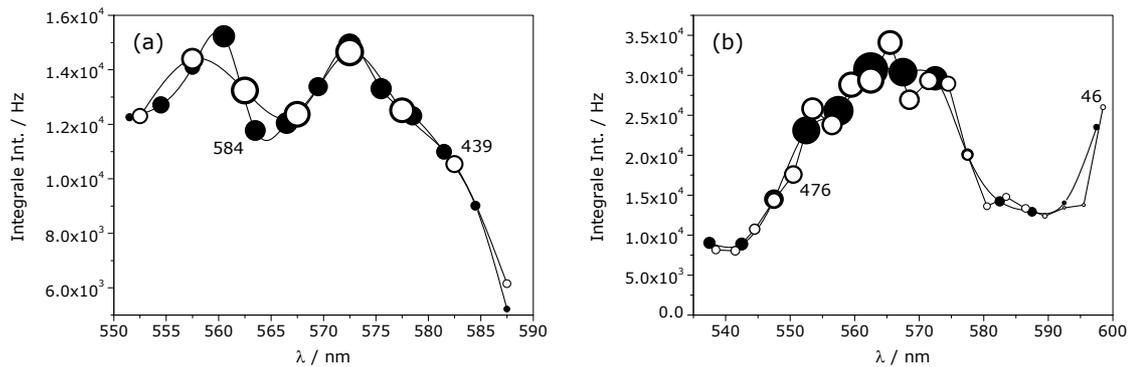


Abbildung 5.17: Gemittelte Fluoreszenzintensität als Funktion der spektralen Lage, hier angegeben durch die integrale Intensität und den spektralen Schwerpunkt. Für beide Farbstoffe wurden Auswertungen mit einer Intervallbreite von 3 und 5 nm durchgeführt (schwarze und weiße Symbole). Die Fläche der Symbole gibt die Anzahl der eingeflossenen Spektren an. Zum Vergleich sind einige Spektrenzahlen an den Symbolen dargestellt. (a) Die Auftragung für PI in PS zeigt ein Minimum bei  $\sim 565$  nm, das globale Maximum liegt bei  $\sim 560$  nm. (b) In der Auftragung für DAPI in PS befindet sich das globale Maximum bei  $\sim 565$  nm, ein Minimum bei  $590$  nm.

Es ist unwahrscheinlich, daß eine dieser Erklärungen alleinige Ursache der Abhängigkeit der Intensität von der spektralen Lage ist. Gerade im Fall von DAPI läßt sich von einer qualitativen Vergleichbarkeit der Auftragungen in Abbildung 5.16 b und Abbildung 5.17 b kaum sprechen. Hier scheinen bei den sehr langwelligen Datenpunkten statistische (bedingt durch die niedrige Spektrenzahl pro Punkt) und systematische Fehler (bedingt durch oft stark abweichende Spektrenformen in diesem Wellenlängenbereich) bedeutsam zu werden. Insbesondere die Auftragung des spektralen Schwerpunkts birgt vielseitige Fehlerquellen. So erwies sich die Anregungsintensität als zeitlich nicht konstant. Durch einen Trägheitseffekt bei der Fasereinkopplung wich die Anregungsintensität des ersten Spektrums jeder 25-Spektren-Sequenz von der der anderen Spektren ab. Diese Abweichung betrifft auch die Aufnahme der Hintergrundspektren. Daher wurde die Mehrheit der Spektren auf eine leicht fehlerhafte Nulllinie korrigiert. Solche Abweichungen von der korrekten Nulllinie beeinflussen den spektralen Schwerpunkt insbesondere bei Spektren geringer Intensität mitunter erheblich, die spektrale Lage und Intensität einzelner Banden jedoch kaum.

Im Fall von PI ist die Lage der Bandenmaxima weiter gestreut als es bei DAPI. Dies ist bereits aus deren Verteilungsfunktionen bekannt. Daher liefern die Auftragungen für PI über einen breiten Wellenlängenbereich Werte auf statistisch relativ sicherer Basis. Hier lassen sich die nach den unterschiedlichen Methoden gewonnenen Auftragungen in wesentlichen Gesichtspunkten gut vergleichen. Speziell die lokalen Minima lassen sich einander bezüglich ihrer Halbwertsbreiten und ihrer spektralen Lagen sehr gut zuordnen. Die Differenz dieser spektralen Lagen beträgt mit 48nm nahezu genau den Wert, den man aufgrund der Verteilungsfunktionen von spektralen Schwerpunkten und Maximalagen der  $0' \rightarrow 0$ -Banden für PI erwartet ( $\sim 44\text{nm}$ ).

### 5.2.3.2 Spektrale Lage / Bandenverhältnis

Die Intensitäten der einzelnen Moleküle ließen sich wegen des Einflusses der molekularen Orientierung im Polymer nicht direkt miteinander vergleichen. Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis der Schwingungsbandenintensitäten  $\Phi_{01}$  als Relativgröße nicht von der Orientierung der Moleküle abhängig. Daher ist bereits die direkte Auftragung des Bandenverhältnisses  $\Phi_{01}$  gegen die Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Schwingungsmaximums  $\lambda_0$  aussagekräftig. Die in Abbildung 5.18 beobachtete Streuung der Bandenverhältnisse ist anders als die in Abbildung 5.15 sichtbare Streuung der Intensitäten nur durch reale photophysikalische Unterschiede der Moleküle bedingt, also durch inhomogene Verbreiterung und Subensembelbildung.

In der direkten Auftragung zeigen sich bereits deutliche Unterschiede im spektralen Verhalten von PI und DAPI. Die in Abschnitt 5.2.2.1 festgestellte weite Streuung der Schwingungsbandenmaxima  $\lambda_0$  für PI, sowie die dem gegenüber enge Verteilung derselben Größe für DAPI spiegeln sich in Abbildung 5.18 wider. Während sich jedoch die Werte für  $\Phi_{01}$  bei PI überwiegend eng um 1,4 gruppieren, zeigen die Bandenverhältnisse bei DAPI eine erhebliche Streuung.

In der direkten Auftragung ist wegen der Streuung der Daten nicht ersichtlich, ob generelle Zusammenhänge zwischen Bandenverhältnis und spektraler Lage für die Farbstoffe bestehen. Um eventuelle Korrelationen der Größen dennoch sichtbar zu machen, wird wie bei der Untersuchung der Korrelation zwischen Intensität und spektraler Lage in Abschnitt 5.2.3.1 verfahren.

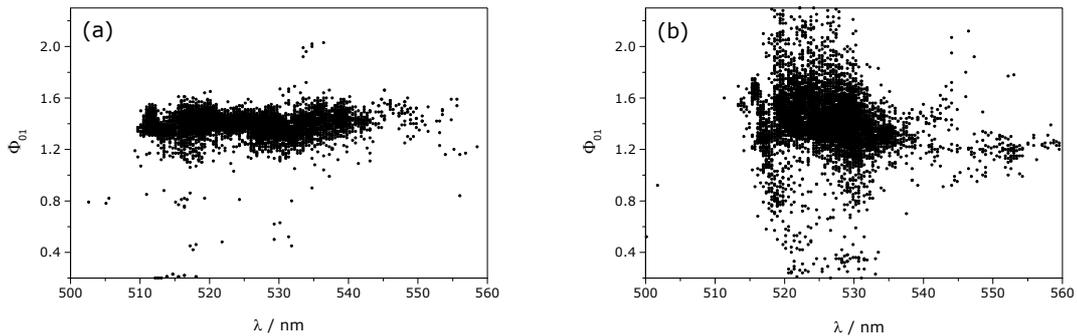


Abbildung 5.18: Direkte Auftragung des Verhältnisses der Schwingungsbandenintensitäten  $\Phi_{01}$  gegen die spektrale Lage des Maximums der  $0' \rightarrow 0$ -Schwingungsbande. (a) Auftragung der Wertepaare von 5378 PI-Spektren. (b) Auftragung der Wertepaare von 7387 DAPI-Spektren. Wiederum wurden jeweils die ersten 100 Spektren pro Molekül einbezogen.

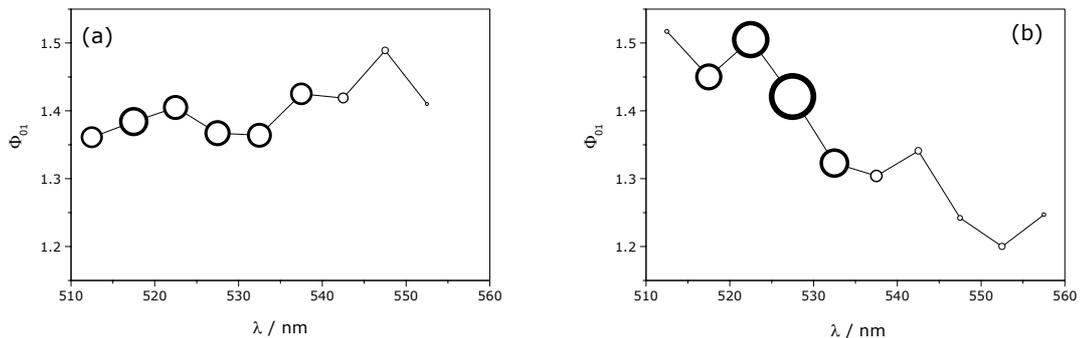


Abbildung 5.19: Gemitteltetes Bandenverhältnis als Funktion der spektralen Lage. Für beide Farbstoffe wurden Auswertungen mit einer Intervallbreite von 5nm durchgeführt. Die Fläche der Symbole gibt die Anzahl der eingeflossenen Spektren an. Das größte Symbol unter (a) entspricht 1131 Spektren, das größte Symbol unter (b) 2925 Spektren. (a) Die Auftragung für PI in PS zeigt eine mit der Wellenlänge leicht steigende Tendenz. (b) In der Auftragung für DAPI in PS zeigt sich eine mit steigender Wellenlänge deutlich fallende Tendenz.

Es werden wiederum Intervalle einer Breite von 5nm gebildet. Aus den Bandenverhältnissen der Datenpunkte in den jeweiligen Intervallen werden Mittelwerte gebildet und diese gegen die Wellenlänge der Intervallhälfte aufgetragen (Abbildung 5.19). Für PI zeigt die tendenzielle Entwicklung des

Bandenverhältnisses mit der Wellenlänge in dieser Darstellung eine leichte Steigung von  $\sim 2,5 \times 10^{-3}/\text{nm}$ , während bei DAPI eine signifikant fallende Tendenz von  $\sim 7,5 \times 10^{-3}/\text{nm}$  zu beobachten ist. Abweichungen von der Tendenz bei einzelnen Punkt zu Punkt-Werten für  $\Delta\Phi_{01}/\Delta\lambda_0$  lassen sich bei DAPI durch statistische Schwankungen erklären, da bis auf den Datenpunkt bei  $\lambda_{01} = 517,5\text{nm}$  alle an abweichendem Verhalten beteiligten Punkte nur geringe Spektrenzahlen aufweisen. Die bei PI an der Abweichung vom monotonen Verhalten beteiligten Punkte um 525nm haben jedoch allesamt mehr als 600 einbezogene Spektren. Das dort beobachtete lokale Minimum ist daher vermutlich physikalisch real.

#### 5.2.4 Spektrale Dynamik

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten die Verteilungsfunktionen der spektralen Zustandsgrößen und Korrelationen zwischen diesen betrachtet wurden, soll dies hier für Prozeßgrößen erfolgen, die zur quantitativen Beschreibung spektraler Dynamik dienen. So sind beispielsweise Korrelationen zwischen Fluktuationen verschiedener spektraler Parameter von Interesse, sowie die Verteilung von Sprungweiten.

Sprünge finden zwischen verschiedenen Zuständen statt, Diffusion innerhalb einzelner Zustände. Daher ist es erforderlich, die Zustände der spektroskopisch untersuchten Moleküle aufzufinden und zur separaten Auswertung voneinander abzugrenzen. Dazu werden jeweils zwei Parameter der Einzelmolekülspektren eines Moleküls gegeneinander aufgetragen (Abbildung 5.21). Einzelne Zustände werden in dieser Auftragung als Häufung von Datenpunkten sichtbar. Zumeist wird das Auftreten eines Moleküls in zwei oder mehr Zuständen bereits im Histogramm mindestens einer der aufgetragenen Größen offensichtlich (Abbildung 5.21). Die einem Zustand zugeordneten Datenpunkte werden isoliert ausgewertet und die in Tabelle 5-4 aufgeführten Eigenschaften protokolliert. Pro Zustand entsteht somit ein Satz dieser Parameter. Die Diffusionseigenschaften eines Zustands lassen sich durch die Größen innerhalb des zugehörigen Datensatzes bestimmen, die Eigenschaften der Übergänge aus dem Vergleich dieser Größen zwischen den zugehörigen Datensätzen der beteiligten Zustände.

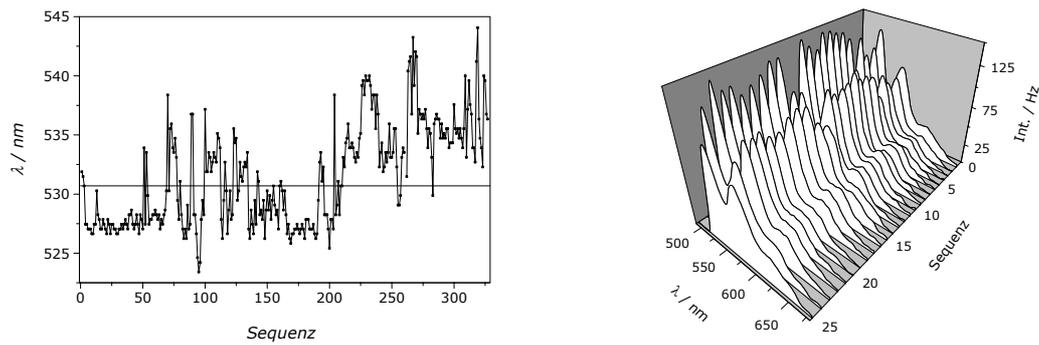


Abbildung 5.20: Trajektorie der Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs des unten ausgewerteten DAPI-Moleküls und ein Ausschnitt aus dessen spektraler Sequenz. Die eingezeichnete Parallele zur Abszisse trennt die Zustände (siehe Abbildung 5.21).

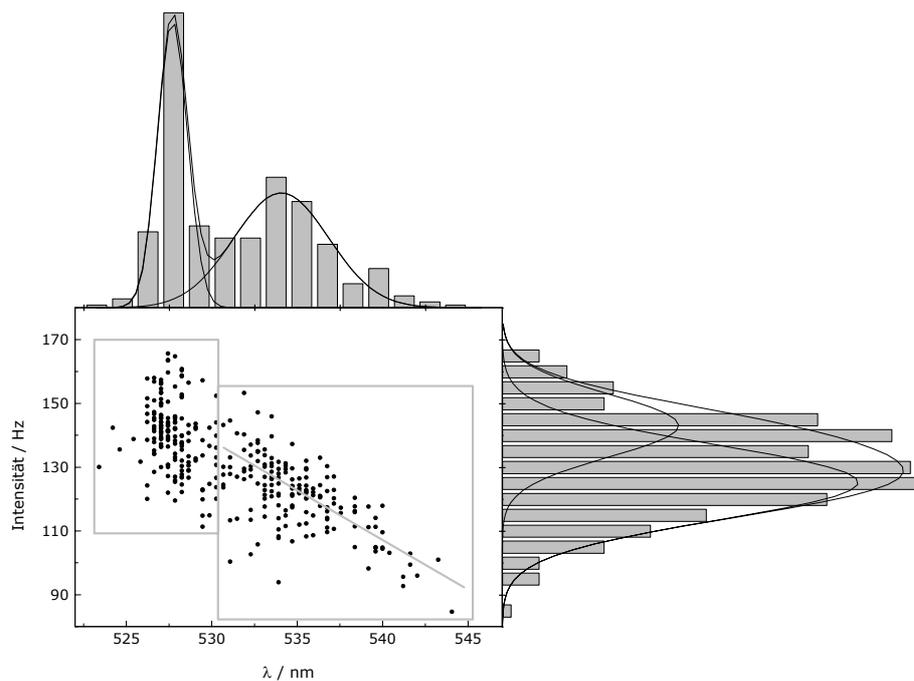


Abbildung 5.21: Auftragung der Intensitäten der  $0' \rightarrow 0$ -Schwingungsbande einer spektralen Sequenz (DAPI) gegen die Wellenlängen dieser Bande. Die Histogramme der aufgetragenen Parameter sind beide bimodal. Zwei Zustände lassen sich deutlich unterscheiden. Während spektral kurzwelligere Zustand keine Korrelation zwischen den Parametern aufweist, zeigt der Längerwellige einen signifikanten Rückgang der Intensität bei Zunahme der Wellenlänge.

$\langle I_0 \rangle$	Mittlere Intensität der gesamten molekularen Sequenz <sup>1</sup>
$\langle I_i \rangle$	Mittlere Intensität der Spektren eines Zustands <sup>1</sup>
$\langle \lambda_i \rangle$	Mittlere Wellenlänge
$\sigma_i$	Standardabweichung der $\lambda_i$
$m_i$	Steigung der Fitgeraden für einen Zustand <sup>2</sup>
$R_i^2$	Korrelationskoeffizient des Fits <sup>2</sup>

Tabelle 5-4: Die für jeden Zustand eines Moleküls bestimmten und protokollierten Größen. (1) Gemessen als Intensität der  $0' \rightarrow 0$ -Bande. Bei Auftragungen des Intensitätsverhältnisses der Banden  $\Phi_{0i}$  werden diese Größen durch  $\langle \Phi_{0i,0} \rangle$  und  $\langle \Phi_{0i,i} \rangle$  ersetzt. (2) Nur bei korrelierenden Parametern.

Da nur ein Teil der untersuchten Moleküle übergangsartige Dynamik zeigt, ist die Anzahl der Datensätze aus der Auswertung der Sprungprozesse insbesondere für PI relativ gering.

Sind die molekularen Zustände in der Auftragung der spektralen Parameter (wie unter Abbildung 5.21) nicht vollständig isoliert, ist die Zuordnung einzelner Datenpunkte zu den einander benachbarten Zuständen ein subjektiver Vorgang, der das Ergebnis der Auswertung unter Umständen maßgeblich beeinflussen kann. Wichtig ist daher, daß die Einteilung und Zuordnung der Datenpunkte möglichst systematisch und nach gleichbleibenden Kriterien erfolgt. Vor der Einteilung und Auswertung der Datenpunkte sollten keine Vorüberlegungen hinsichtlich der zu erwartenden Resultate und deren Konsistenz zu anderen Experimenten geführt werden. Dies brächte ansonsten die Gefahr mit sich, bewußt oder unbewußt die Zuordnung der Datenpunkte zu den Zuständen so zu beeinflussen, daß das erwartete Ergebnis gefördert würde. Die in diesem Abschnitt durchgeführten Auswertungen sind in diesem Zusammenhang weitgehend frei von Artefakten.

#### 5.2.4.1 Spektrale Diffusion

Es wird die Diffusion der wichtigsten spektralen Parameter untersucht: (1) der Intensität, (2) der spektralen Lage, in Form der Wellenlänge der  $0' \rightarrow 0$ -Bande,  $\lambda_0$ , und (3) des Intensitätsverhältnisses von  $0' \rightarrow 0$ - und  $0' \rightarrow 1$ -Bande,  $\Phi_{01}$ . Dabei werden die Veränderungen der spektralen Lage jeweils mit denen der beiden anderen

Parameter auf Korrelation überprüft. Die Standardabweichung  $\sigma_i$  der spektralen Lage gibt dabei das Ausmaß der Fluktuation von  $\lambda_0$  für einen Zustand an. Die Verteilung dieser Größe für beide Farbstoffe zeigt, daß die spektrale Lage bei PI in stärkerem Ausmaß fluktuiert als es bei DAPI der Fall ist (Abbildung 5.22). Der drastische Rückgang der Beobachtung von Abweichungen  $\sigma < 0,5$  ist dürfte eine Folge des Signalrauschens bei der Aufnahme der Spektren sein. Bei der Glättung der Spektren entsteht aus dem Rauschen des Rohspektrums eine meßtechnisch bedingte Fluktuation, die den photophysikalisch realen Fluktuationen überlagert ist.

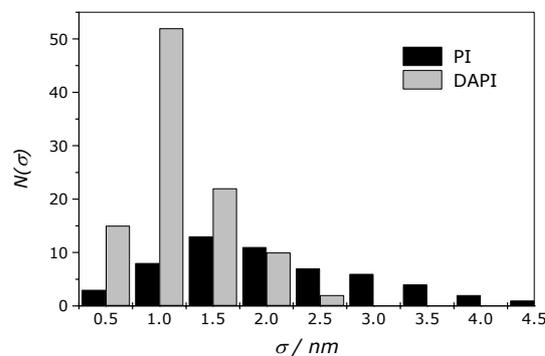


Abbildung 5.22: Verteilungen der Standardabweichung  $\sigma_i$  bei der Diffusion der spektralen Lage. Für PI wurden darüber hinaus 5 Zustände mit  $\sigma > 5\text{nm}$  beobachtet, für DAPI 3 mit  $\sigma > 3\text{nm}$ . Die Balken geben die Anzahl der Beobachtungen in dem Intervall von  $0,5\text{nm}$  unterhalb des Abszissenwerts an.

#### 5.2.4.1.1 Spektrale Lage / Intensität

Alle aufgenommenen Sequenzen von PI und DAPI mit einer Spektrenzahl von  $X > 50$  werden auf die beschriebene Art (Abbildung 5.21) ausgewertet. Sequenzen, die weder Übergänge zeigen, noch Korrelation von diffundierenden Parametern, wurden aus der Analyse ausgesondert. Danach flossen für PI 35 von 76, und für DAPI 49 von 133 Molekülsequenzen in die Auswertung ein. Jeder der in diesen Sequenzen aufgefundene spektrale Zustand wurde separat auf sein Diffusionsverhalten untersucht (gemäß Tabelle 5-4). Die Resultate der Analyse werden auf zwei Weisen dargestellt:

Im *Pfeildiagramm* (Abbildung 5.23) sind bis auf  $\sigma$  alle bestimmten Größen wiedergegeben. Der Abszissenwert der Datenpunkte (runde Symbole) bezeichnet die mittlere Wellenlänge der  $0' \rightarrow 0$ -Schwingungsbande des jeweiligen Zustands  $\langle \lambda_i \rangle$ , der Ordinatenwert die dementsprechende mittlere Intensität  $\langle I_i \rangle$ . Die Länge der von den Punkten ausgehenden Pfeilen ist ein Maß für den Korrelationskoeffizienten  $R^2$  zwischen Lage und Intensität der Schwingungsbande im untersuchten Zustand. Die Richtung dieser Pfeile entspricht der Steigung  $m$  der Fitgeraden. Der Vorteil dieser Auftragung liegt in der gleichzeitigen Darstellung der wichtigsten Diffusionseigenschaften und deren Bezüge untereinander.

Im *Steigungsdiagramm* (Abbildung 5.24) fehlt die Angabe der mittleren Intensität  $\langle I_i \rangle$ . Die Ordinate gibt hier die Steigung der Fitgerade an, zur Vergleichbarkeit der Zustände normiert auf die mittlere Intensität.  $m_i / \langle I_i \rangle$ . Auf der Abszisse ist wiederum die mittlere Wellenlänge  $\langle \lambda_i \rangle$  aufgetragen, die Größe der Datenpunkte (quadratische Symbole) gibt den Korrelationskoeffizient an. Die Werte für  $m_i / \langle I_i \rangle$  als Funktion von  $\langle \lambda_i \rangle$  sind durch ein Polynom 6. Grades interpoliert.

Wird die Abhängigkeit der Steigung von der mittleren Wellenlänge eines Zustands als Folge der simultanen Diffusion des Absorptionsspektrums über die Anregungswellenlänge interpretiert (siehe Abschnitt 5.2.3.1 und Abbildung 5.25), läßt sich die Interpolation wie folgt deuten: Bei der synchronen Diffusion von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum eines einzelnen Moleküls ändert sich die Fluoreszenzrate entsprechend des sich ändernden Absorptionsquerschnitts an der Anregungswellenlänge. Die ermittelte Steigung  $m_i / \langle I_i \rangle$  entspricht also der negativen ersten Ableitung des Einzelmolekül-Absorptionsspektrums bei 488nm. Demnach korrespondiert wegen  $\partial i(\lambda) / \partial \lambda = 0$  und  $\partial^2 i(\lambda) / \partial \lambda^2 > 0$  der in Abbildung 5.24 mit (1) markierte Punkt mit einer spektralen Lage, bei der das Mittel der Einzelmolekül-Absorptionsspektren sein lokales Minimum aufweist. Nach dieser Argumentation läßt sich der mit (2) gekennzeichnete Punkt wegen  $\partial i(\lambda) / \partial \lambda = 0$  und  $\partial^2 i(\lambda) / \partial \lambda^2 < 0$  dem Maximum der  $0 \rightarrow 1'$ -Absorptionsbande zuordnen.

Trifft die beschriebene Interpretation zu, sind die mittleren Stokes-Verschiebungen der Einzelmoleküle zugänglich (siehe Abschnitt 5.2.3.1), die mit den im Ensembleexperiment gewonnenen Werten verglichen werden können. Dabei wird wiederum der Abstand zwischen Absorptionsminimum und Maximum der  $0 \rightarrow 0'$ -Absorptionsbande aus den Ensemblespektren benutzt ( $\sim 14$ nm für PI und DAPI).

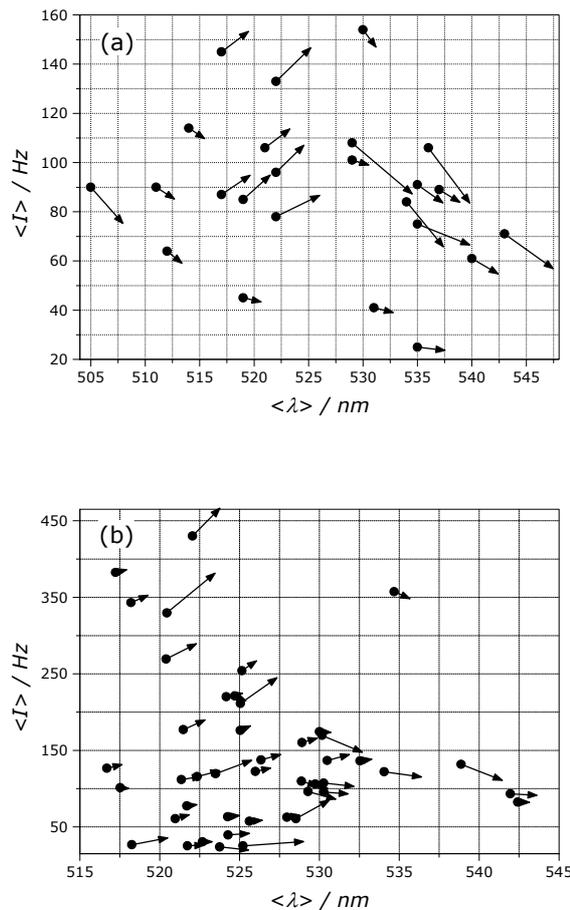


Abbildung 5.23: Pfeildiagramm zur simultanen Darstellung von mittlerer Wellenlänge und Intensität des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs der Einzelmolekülzustände, sowie deren linearen Abhängigkeiten  $m$  und Korrelationskoeffizienten  $R^2$ , dargestellt als Richtung und Länge der Vektorpfeile. (a) 24 Zustände von 21 PI-Molekülen mit  $R^2 > 0,2$ . (b) 47 Zustände von 37 DAPI-Molekülen mit  $R^2 > 0,1$ . Für beide Farbstoffe ist eine deutliche Abhängigkeit der mittleren Intensität  $\langle I \rangle$  und der Steigung  $m$ , von der spektralen Lage zu erkennen.

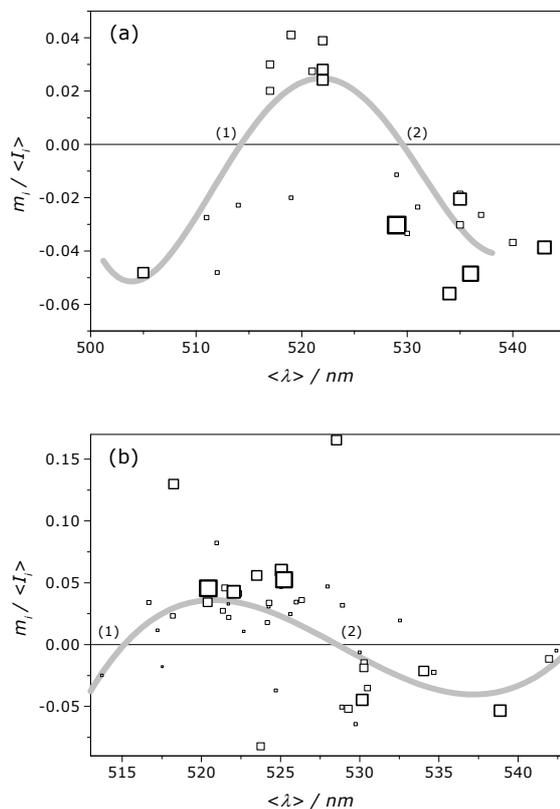


Abbildung 5.24: Auftragung der linearen Abhängigkeiten zwischen Intensität und Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs der einzelnen Zustände in Abhängigkeit von ihrer mittleren spektralen Lage (Steigungsdiagramm). Die Größe der Symbole gibt den zugehörigen Korrelationskoeffizient an. Die Interpolation ist ein polynomischer Fit 6. Grades. (a) 24 Zustände von 21 PI-Molekülen mit  $R^2 > 0,2$ . (b) 47 Zustände von 37 DAPI-Molekülen mit  $R^2 > 0,1$  (wie in Abbildung 5.23).

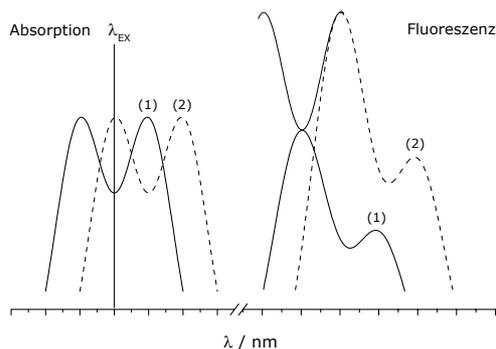


Abbildung 5.25: Zur Interpretation der Korrelation zwischen spektraler Lage und Intensität bei Diffusionsvorgängen als Folge der simultanen Verschiebung des Absorptionsspektrums über die Anregungswellenlänge. Die dünne Linie entspricht einem spiegeltäglichem Abbild des Absorptionsspektrums.

Für die einzelnen PI-Moleküle berechnet sich eine mittlere Stokes-Verschiebung von  $\Delta\lambda = (514,3 - (488 + 14))\text{nm} = 12,3\text{nm}$ . Das ist bei der erheblichen Streuung der Steigungen in Abbildung 5.24 und der daher relativ unsicheren Interpolation ein dem Ensembleergebnis (15,3nm) sehr vergleichbarer Wert. Im Fall von DAPI ergibt sich ein Wert von  $\Delta\lambda = (515,2 - (488 + 14))\text{nm} = 13,2\text{nm}$ . Hier ist die Übereinstimmung mit dem Ensemblewert (15,9nm) sogar noch besser. Die Interpretation der Korrelation zwischen spektraler Lage und Intensität bei Diffusionsvorgängen als Effekt der Verschiebung der Absorptionsspektren von Einzelmolekülen relativ zur Anregungswellenlänge wird durch die vorgenommenen Auswertungen gestützt und scheint somit zuzutreffen.

#### 5.2.4.1.2 Spektrale Lage / Intensitätsverhältnis der vibronischen Banden

Ausgewertet wurden alle Sequenzen mit  $X > 75$  Spektren, die eine erkennbare Dynamik des Intensitätsverhältnisses zwischen  $0' \rightarrow 0$ - und  $0' \rightarrow 1$ -Schwingungsbande zeigen. Dies ist für PI bei 14 von 76 Molekülen der Fall. Davon weisen 5 Moleküle 9 Zustände mit korreliert diffundierenden Parametern auf. Für DAPI wurden bei 16 von 133 Molekülen insgesamt 19 Zustände an 11 Molekülen identifiziert und analysiert.

Die Resultate der Auswertung werden wie im vorangegangenen Abschnitt als Pfeil- (Abbildung 5.26) und Steigungsdiagramm (Abbildung 5.27) dargestellt. Als Relativgröße ist das Bandenverhältnis  $\Phi_{01}$  verschiedener Zustände ohne Normierung vergleichbar.

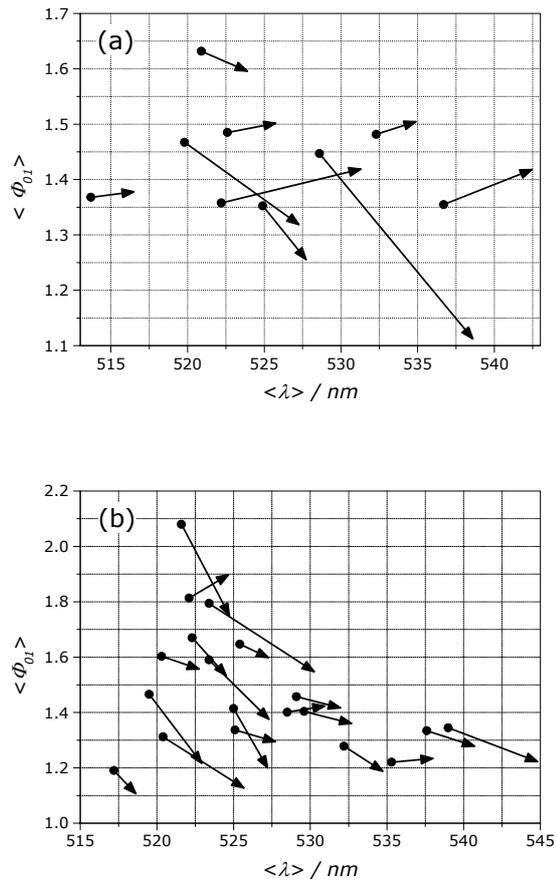


Abbildung 5.26: Pfeildiagramm zur simultanen Darstellung von mittlerer Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs und mittlerem Intensitätsverhältnis der Banden der Einzelmolekülzustände, sowie deren lineare Abhängigkeiten  $m$  und Korrelationskoeffizienten  $R^2$ , dargestellt als Richtung und Länge der Vektorpfeile. (a) 9 Zustände von 5 PI-Molekülen mit  $R^2 > 0,2$ . (b) 19 Zustände von 11 DAPI-Molekülen mit  $R^2 > 0,02$ . Bei DAPI ist ein Absinken von  $\Phi_{01}$  bei langwelliger Verschiebung für fast alle Datenpunkte zu verzeichnen.

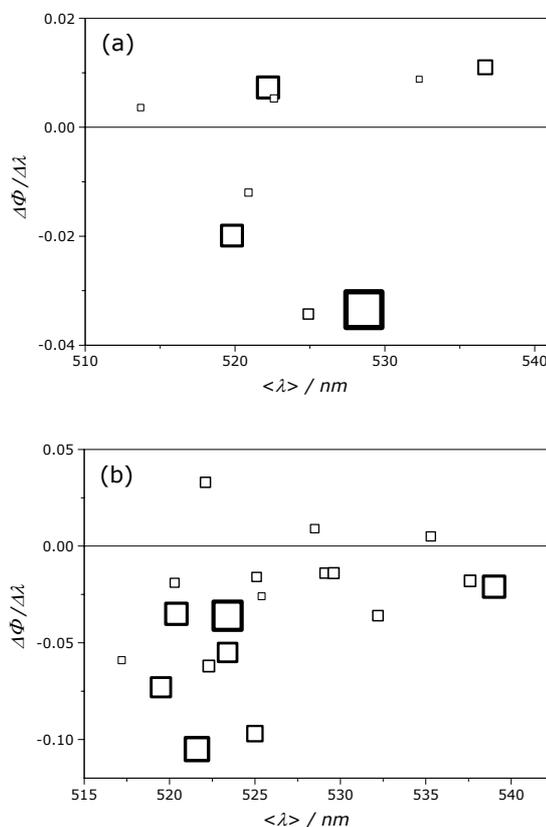


Abbildung 5.27: : Auftragung der linearen Abhängigkeiten zwischen dem Bandenverhältnis und der Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Übergangs der einzelnen Zustände abhängig von ihrer mittleren spektralen Lage (Steigungsdiagramm). Die Größe der Symbole gibt den zugehörigen Korrelationskoeffizienten an. Es sind die selben Zustände dargestellt wie in Abbildung 5.26. Im Falle von PI ist keine Tendenz erkennbar, bei DAPI jedoch steigt die Tendenz der Werte mit der Wellenlänge bis knapp unter Null.

Sowohl im Pfeil- als auch im Steigungsdiagramm offenbart sich für DAPI eine Abhängigkeit der Steigungen der Fitgeraden  $m_i$  von den mittleren Wellenlängen  $\langle \lambda_i \rangle$  der Zustände. Der Großteil der Datenpunkte über den gesamten untersuchten Spektralbereich weist negative Steigungen auf. Der Betrag der mittleren  $m_i$  fällt dabei mit steigender Wellenlänge. Das bedeutet das bei DAPI kombinierte Diffusion nach S1- und S2-Typ fast ausschließlich in einer Weise abläuft, bei der eine Verringerung des  $S_0$ - $S_1$ -Abstands von einer Vergrößerung der isoenergetischen Versetzung zwischen den Potentialsenken von  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustand begleitet wird (Abbildung 5.28). Im Pfeildisgramm ist zudem eine abnehmende Tendenz der mittleren Intensitätsverhältnisse  $\langle \Phi_{01,i} \rangle$  mit zunehmender Wellenlänge erkennbar. Die Auftragungen für PI lassen, schon aufgrund der geringen Zahl von Datenpunkten, keine Interpretationen zu. Einzig die geringe Streuung der Werte für  $\langle \Phi_{01,i} \rangle$  bei PI gegenüber denen von DAPI ist augenfällig.

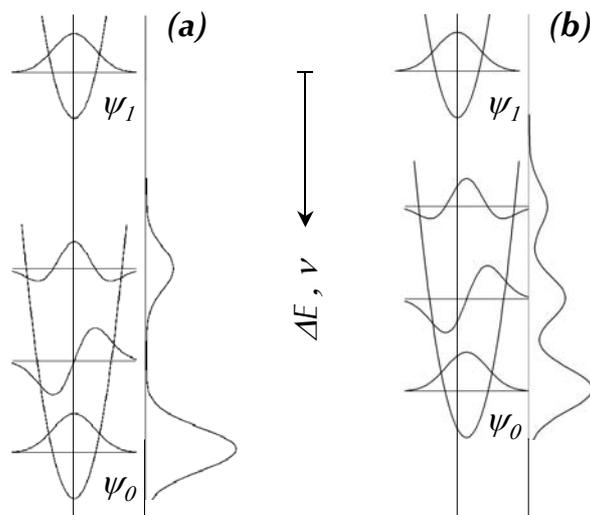


Abbildung 5.28: Schematische Darstellung der Kombination von S1- und S2-Prozess. Im abgebildeten Fall wird der Abstand zwischen angeregtem und Grundzustand bei gleichzeitiger Zunahme der isoenergetischen Versetzung der Potentialtöpfe reduziert. Dies entspricht dem bei der simultanen Diffusion der entsprechenden Parameter im Fall von DAPI beobachteten Verhalten.

### 5.2.4.2 Spektrale Sprünge

Es werden die Sprünge der wichtigsten spektralen Parameter untersucht: (1) der Intensität, (2) der spektralen Lage, in Form der Wellenlänge der  $0' \rightarrow 0$ -Bande,  $\lambda_0$ , und (3) des Intensitätsverhältnisses von  $0' \rightarrow 0$ - und  $0' \rightarrow 1$ -Bande,  $\Phi_{01}$ . Dabei werden die Veränderungen der spektralen Lage jeweils mit denen der beiden anderen Parameter auf Korrelation überprüft, sowie die Sprungweitenverteilung der Parameter auf Häufungen.

#### 5.2.4.2.1 Spektrale Lage / Intensität

Es wurden die bereits unter 5.2.4.1.1 bezüglich ihrer Diffusionseigenschaften untersuchten molekularen Sequenzen zur Analyse der übergangsartigen Dynamik herangezogen, also 35 von 76 für PI und 49 von 133 für DAPI. Davon tragen alle molekularen Sequenzen, die mehr als einen Zustand aufweisen, zur Auswertung bei. Das sind im Fall von PI 22 Moleküle, die insgesamt 50 Zustände zeigen, im Fall von DAPI 41 Moleküle mit 105 Zuständen.

Zur vergleichbaren Darstellung der spektralen Sprünge dienen zwei Arten der Auftragung. Bei der ersten werden die mittleren Intensitäten  $\langle I_i \rangle$  aller Zustände eines Moleküls auf die des kurzwelligsten Zustands  $\langle I_0 \rangle$  normiert. Die normierten Werte des jeweiligen Moleküls werden gegen die mittleren Wellenlängen  $\langle \lambda_i \rangle$  der Zustände aufgetragen und mit einer Linie verbunden (Abbildung 5.29 a). Die Linienzüge beginnen daher alle bei  $\langle I_i \rangle / \langle I_0 \rangle = 1$  auf der kurzwelligen Seite. Um die Faktoren der Intensitätszu- und abnahmen vergleichbar darzustellen, wird hier eine logarithmische Ordinate benutzt. Der Vorteil dieser Auftragung liegt in der gleichzeitigen Sichtbarkeit der absoluten Intensitäten und spektralen Lagen der Zustände eines Moleküls, sowie den relativen Verhältnissen der Intensitäten und Differenzen der spektralen Lagen dieser Zustände. Bei der zweiten Art der Darstellung fehlt jede Information über die absoluten Eigenschaften der Zustände. Es werden pro beobachtetem Übergang jeweils die Sprungweiten der spektralen Lage und der Intensität angegeben (Abbildung 5.29 b). Des Weiteren ist nicht mehr erkennbar, ob zwei Übergänge an einem Molekül beobachtet wurden, oder an zwei. Das Verhältnis der Intensitäten der Zustände  $\langle I_1 \rangle / \langle I_2 \rangle$  wurde immer so gewählt, daß das Quotient kleiner eins ist. Die Sprungweite der Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Maximums ist als Betrag in Wellenzahlen angegeben. Diese Art der

Auftragung dient dem Auffinden von Häufungen in den Verteilungen der Sprungweiten.

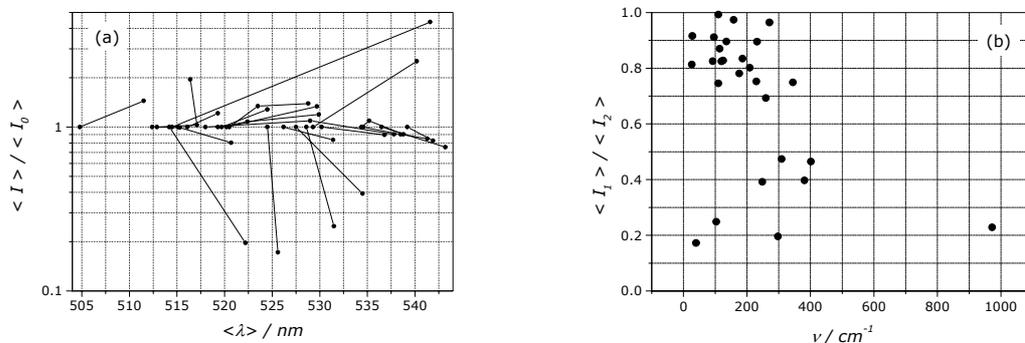


Abbildung 5.29: Auswertung der übergangsartigen Dynamik von 22 PI-Molekülen mit insgesamt 50 Zuständen. (a) Auftragung der Parameter der einzelnen Zustände. Zu einem Molekül gehörende Zustände sind mit einer Linie verbunden. Die Intensitäten der Zustände eines Moleküls sind jeweils auf die Intensitäten des kurzwelligsten Zustands  $\langle I_0 \rangle$  normiert. (b) Auftragung der Sprungweiten. Das Verhältnis der mittleren Intensitäten der beteiligten Zustände  $\langle I_i \rangle$  ist stets so gewählt, daß das Resultat kleiner eins ist. Die Sprungweite der spektralen Lage ist als Betrag angegeben.

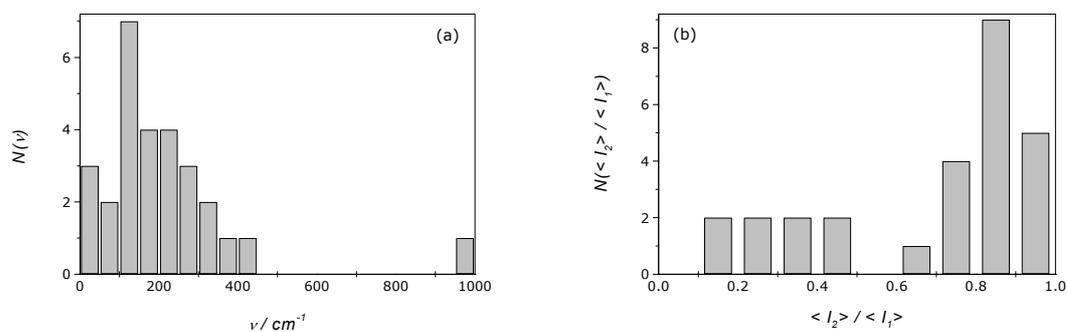


Abbildung 5.30: Verteilungsfunktionen der Sprungweiten für PI. (a) Die überwiegende Mehrheit an Sprungweiten der spektralen Lage liegt zwischen 0 und  $450 \text{cm}^{-1}$ . Lediglich ein Ereignis mit  $\nu > 900 \text{cm}^{-1}$  wurde beobachtet. (b) Die Sprungweiten im Verhältnis der Intensitäten zeigen eine deutliche Häufung im Bereich geringer Änderungen zwischen 0,6 und 1, sowie einige Ereignisse im Bereich stärkerer Änderungen zwischen 0,1 und 0,5. Ob es sich hier um eine physikalisch reale Gruppierung handelt oder eine zufällige Verteilung, kann bei der geringen Zahl an Beobachtungen nicht beantwortet werden.

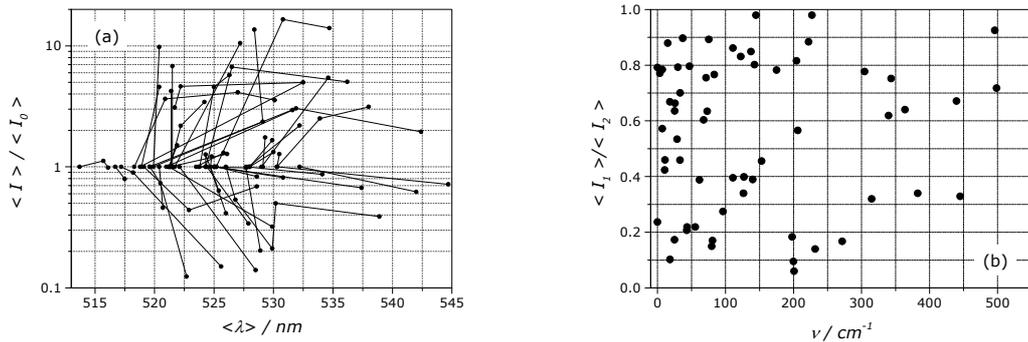


Abbildung 5.31: Auswertung der übergangsartigen Dynamik von 41 DAPI-Molekülen mit insgesamt 105 Zuständen. (a) Auftragung der Parameter der einzelnen Zustände. Zu einem Molekül gehörende Zustände sind mit einer Linie verbunden. Die Intensitäten der Zustände eines Moleküls sind jeweils auf die Intensität des kurzwelligsten Zustands normiert. (b) Gegenüberstellung der Sprungweiten. Das Verhältnis der mittleren Intensitäten der beteiligten Zustände ist stets so gewählt, daß das Resultat kleiner eins ist. Die Sprungweite der spektralen Lage ist als Betrag angegeben.

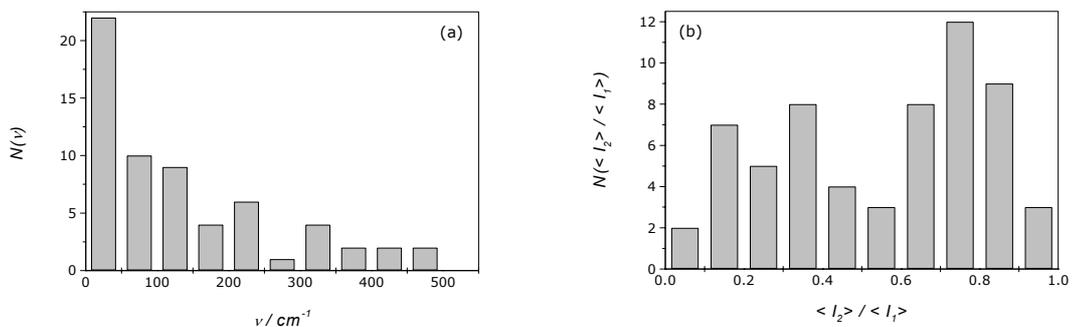


Abbildung 5.32: Verteilungsfunktionen der Sprungweiten für DAPI. (a) Bei den Sprungweiten der spektralen Lage ist eine tendenzielle Abnahme der Beobachtungen mit steigender Sprungweite zu verzeichnen. (b) Sprungweiten im Verhältnis der Intensitäten werden in jeder Größe beobachtet. Ob die auftretenden Akkumulationen um 0,3 und 0,8 physikalisch real sind, läßt sich auch hier nicht entscheiden.

Bei der Betrachtung von Abbildung 5.29 a und Abbildung 5.31 a ist für keinen der beiden Farbstoffe eine Abhängigkeit des Sprungverhaltens von der mittleren Wellenlänge der Zustände zu erkennen. Im Gegensatz zur Diffusion ist bei Sprungphänomenen daher die Verknüpfung von spektraler mit Intensitätsdynamik nicht über Änderungen des Absorptionsquerschnitts an der Anregungswellenlänge durch die simultane Verschiebung von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum erklärbar.

Die mit (b) bezeichneten Diagramme dieser Abbildungen dienen dem Auffinden von systematischen Zusammenhängen zwischen den Sprungweiten in Intensität und spektraler Lage, sowie Gruppierungen dieser Sprungweiten. Für PI und DAPI sind keine Korrelationen zwischen den Sprungweiten der untersuchten Größen zu erkennen. Vielmehr scheint deren Verknüpfung völlig unsystematisch zu sein.

Um Häufungen der Sprungweiten sichtbar zu machen, wurden die Verteilungsfunktionen der gegeneinander aufgetragenen Werte gebildet (Abbildung 5.30 und Abbildung 5.32). Bei den Sprungweiten der spektralen Lage zeigt PI eine Gruppierung um den Wert  $\nu \approx 150\text{cm}^{-1}$  und einen stark abweichenden Sprung mit  $\nu \approx 970\text{cm}^{-1}$ . Die in Abschnitt 5.2.2.4 bestimmten energetischen Abstände zwischen den spektralen Subensembeln bei PI von  $\sim 325$ ,  $\sim 400$  und  $\sim 445\text{cm}^{-1}$  liegen zwar im hochfrequenten Ausläufer der Gruppierung, der überwiegende Teil der beobachteten Sprünge zeigt jedoch wesentlich geringere Sprungweiten. Deren Häufung lässt sich daher nicht auf einfache Weise durch intrinsische Übergänge zwischen den bereits identifizierten Subensembeln deuten. Die Häufung der analogen Sprungweiten bei DAPI fällt mit steigender Wellenzahl ähnlich einem exponentiellen Absinken. Ein solche Verteilungsfunktion ist ein Indiz für das Überwiegen extrinsischer Ursachen dieser Dynamik.

Die Histogramme über die Verhältnisse der mittleren Intensitäten, die an den Zuständen eines Moleküls beobachtet werden, zeigt für beide Farbstoffe zwei wenig ausgeprägte Gruppierungen um  $\langle I_2 \rangle / \langle I_1 \rangle \approx 0,3$  und  $0,8$ . Bei der niedrigen Anzahl von Beobachtungen ist jedoch sehr unsicher, ob diese Akkumulationen einen physikalisch realen Hintergrund besitzen. Sollten PI- und DAPI-Moleküle tatsächlich bevorzugte relative Intensitätszustände aufweisen, die keinen systematischen Zusammenhang mit deren mittlerer spektraler Lage oder der spektralen Sprungweite zeigen, ist die Ursache dieses Phänomens rätselhaft.

#### 5.2.4.2.2 Spektrale Lage / Intensitätsverhältnis der vibronischen Banden

Es wurden die bereits unter 5.2.4.1.2 bezüglich ihrer Diffusionseigenschaften untersuchten molekularen Sequenzen zur Analyse der übergangsartigen Dynamik herangezogen, also 14 von 76 für PI und 16 von 133 für DAPI. Davon tragen alle molekularen Sequenzen, die mehr als einen Zustand aufweisen, zur Auswertung bei. Das sind im Fall von PI 12 Moleküle, die insgesamt 26 Zustände zeigen, im Fall von DAPI 16 Moleküle mit 37 Zuständen.

Die Darstellung der Ergebnisse dieser Auswertung ist der bei den Intensitätssprüngen angewandten sehr ähnlich. Die einzigen Unterschiede sind durch die Andersartigkeit der untersuchten spektralen Parameter  $I$  und  $\Phi_{01}$  bedingt. Während die durch die statistisch verteilte Orientierung der Übergangsdipolmomente beeinflusste Intensität  $I$  eine Normierung erfordert, um Vergleiche zwischen Molekülen zuzulassen, ist das für die Relativgröße  $\Phi_{01}$  nicht nötig. Die gemessenen mittleren Verhältnisse  $\langle\Phi_{01}\rangle$  werden unverändert gegen die mittlere Wellenlänge  $\langle\lambda_0\rangle$  aufgetragen (Abbildung 5.33 a und Abbildung 5.35 a). Die Darstellung der Sprungweiten der Größen  $\langle\Phi_{01}\rangle_i$  und  $v_i$  erfolgt völlig analog der von  $\langle I_i\rangle$  und  $v_i$  im vorangehenden Abschnitt. Wieder ist auf der Abszisse der Betrag der Sprungweite der spektralen Lage in Wellenzahlen angegeben, auf der Ordinate das Verhältnis zwischen den Intensitätsquotienten von  $0' \rightarrow 0$ - und  $0' \rightarrow 1$ -Bande der am Sprung beteiligten Zustände,  $\langle\Phi_{01}\rangle_1/\langle\Phi_{01}\rangle_2$ .

Auf Grund der geringen Anzahl beobachteter Sprünge mit Änderung des Bandenintensitätsverhältnisses  $\Phi_{01}$  an beiden Farbstoffen lassen sich kaum gesicherte Aussagen über diesen Typ spektraler Aussagen machen. Augenfällig ist jedoch das tendenzielle Ansteigen der absoluten Werte von  $\langle\Phi_{01}\rangle$  mit der mittleren Wellenlänge  $\langle\lambda\rangle$  der Zustände bei PI, während DAPI das entgegengesetzte Verhalten zeigt. Das eigentliche dynamische Verhalten, beschrieben durch Prozeßgrößen wie die Sprungweiten der spektralen Parameter, zeigt keine auffälligen Gruppierungen oder Korrelationen. Scheinbare Häufungen in den Verteilungsfunktionen der Sprungweiten liegen bei der vorherrschenden Datenlage im Bereich statistischer Schwankungen. Bereits geringe Änderungen der Schrittweite der Histogramme beeinflussen den Verlauf der Verteilungsfunktionen in den hier beschriebenen Fällen substantiell.

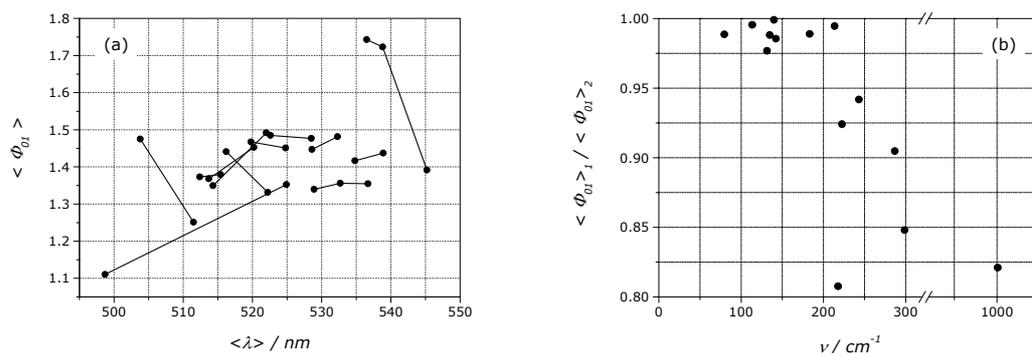


Abbildung 5.33: Auswertung der übergangsartigen Dynamik von 12 PI-Molekülen mit insgesamt 26 Zuständen. (a) Auftragung der Parameter der einzelnen Zustände. Zu einem Molekül gehörende Zustände sind mit einer Linie verbunden. (b) Gegenüberstellung der Sprungweiten. Das Verhältnis der mittleren  $\Phi_{01}$  der beteiligten Zustände ist stets so gewählt, daß das Resultat kleiner eins ist. Die Sprungweite der spektralen Lage ist als Betrag angegeben.

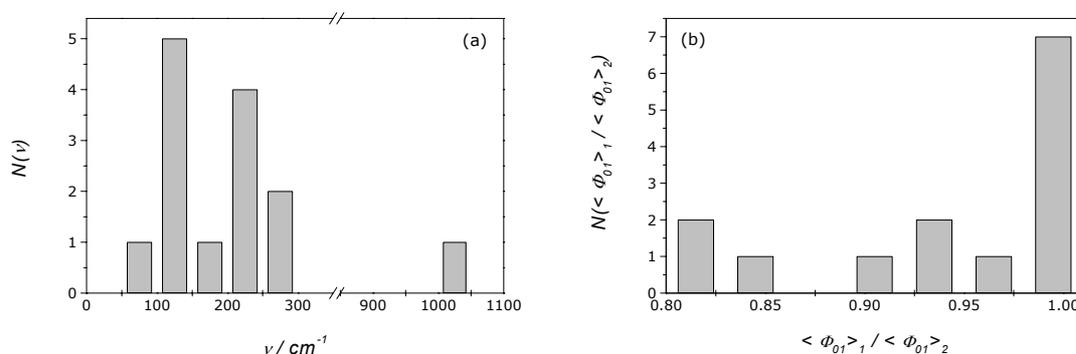


Abbildung 5.34: Verteilungsfunktionen der Sprungweiten für PI. (a) Die überwiegende Mehrheit an Sprungweiten der spektralen Lage liegt zwischen 50 und  $300\text{cm}^{-1}$ . Lediglich ein Ereignis mit  $\nu > 1000\text{cm}^{-1}$  wurde beobachtet. (b) Die Sprungweiten im Verhältnis der  $\Phi_{01}$  zeigen eine deutliche Häufung im Bereich geringer Änderungen zwischen 0,9 und 1, sowie drei Ereignisse im Bereich moderater Änderungen zwischen 0,8 und 0,85. Ob es sich hier um eine physikalisch reale Gruppierung handelt oder eine zufällige Verteilung, kann bei der geringen Zahl an Beobachtungen auch hier nicht beantwortet werden.

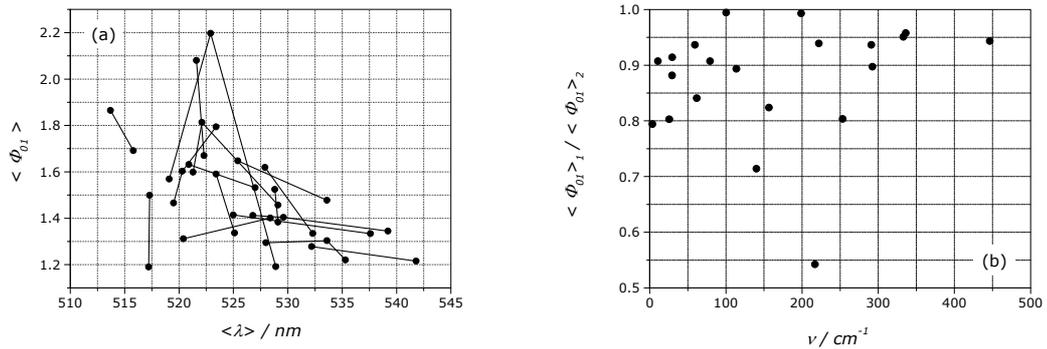


Abbildung 5.35: Auswertung der übergangsartigen Dynamik von 16 DAPI-Molekülen mit insgesamt 37 Zuständen. (a) Auftragung der Parameter der einzelnen Zustände. Zu einem Molekül gehörende Zustände sind mit einer Linie verbunden. (b) Gegenüberstellung der Sprungweiten. Das Verhältnis der mittleren  $\Phi_{01}$  der beteiligten Zustände ist stets so gewählt, daß das Resultat kleiner eins ist. Die Sprungweite der spektralen Lage ist als Betrag angegeben.

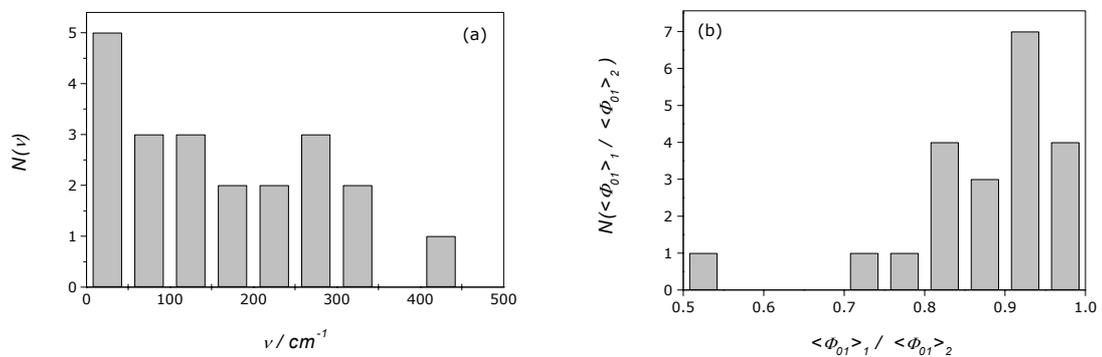


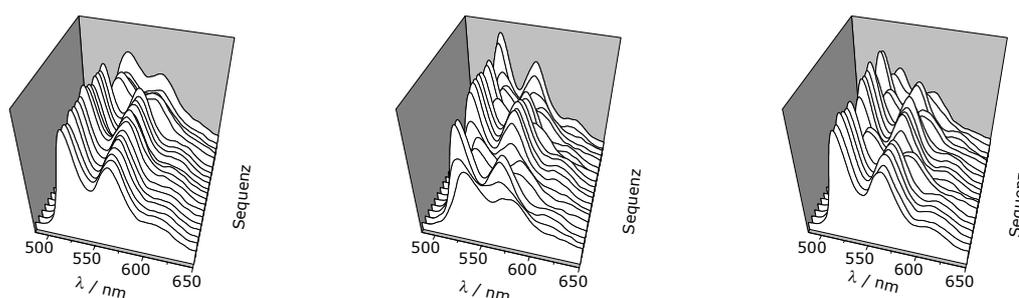
Abbildung 5.36: Verteilungsfunktionen der Sprungweiten für DAPI. (a) Bei den Sprungweiten der spektralen Lage ist eine tendenzielle Abnahme der Beobachtungen mit steigender Sprungweite zu verzeichnen. (b) Sprungweiten im Verhältnis der  $\Phi_{01}$  werden von 0,7 bis 1 beobachtet. Ein weiter Sprung führt zu einem Ereignis bei 0,5. Wegen die geringe Zahl der Beobachtungen lassen sich die beiden Verteilungen nicht interpretieren.

### 5.2.5 Spezielle Fallstudien

Ist die repräsentative statistische Auswertung spezieller Phänomene auf Grund geringer Beobachtungszahlen nicht möglich, ist es zur Veranschaulichung spezieller Analyseverfahren dennoch oft interessant, Fallstudien an den spektralen Sequenzen einzelner Moleküle durchzuführen. Das gilt natürlich insbesondere für einmalig auftretende Erscheinungsformen spektraler Dynamik. Für statistische Analysen einzelner spektraler Sequenzen eignen sich offensichtlich solche mit hoher Spektren- und Ereigniszahl. Dazu ist zur Auswertung eine deutlich ausgeprägte Dynamik hilfreich. Hier werden im Hinblick auf Übergangs-, respektive diffusionsartige Dynamik zwei molekulare Sequenzen diskutiert, die nach diesen Kriterien ausgewählt wurden.

#### 5.2.5.1 Übergänge

Die zur Auswertung eines spektralen Übergangs zwischen zwei Zuständen ausgewählte DAPI-Sequenz zeigt 317 Sekundenspektren, bevor das beobachtete Farbstoffmolekül irreversibel ausbleicht. In dieser Zeit sind 54 Sprünge zwischen zwei Zuständen zu verzeichnen, die mit einer deutlichen spektralen Verschiebung von  $|\Delta\nu_0| \approx 480\text{cm}^{-1}$  einhergehen. Die Fluoreszenzintensität der Zustände unterscheidet um ungefähr den Faktor 1,8. Da dieser Übergang weder wiederholt an mehreren Molekülen beobachtet wurde, noch seine Erscheinungsform als Sprung zwischen den Phänotypen zweier DAPI-Subensemble interpretierbar ist, liegt ein extrinsischer Effekt als Ursache nahe. Die komplette molekulare Sequenz ist in Abbildung 5.37 dargestellt, unterteilt in 20-Spektren-Serien.



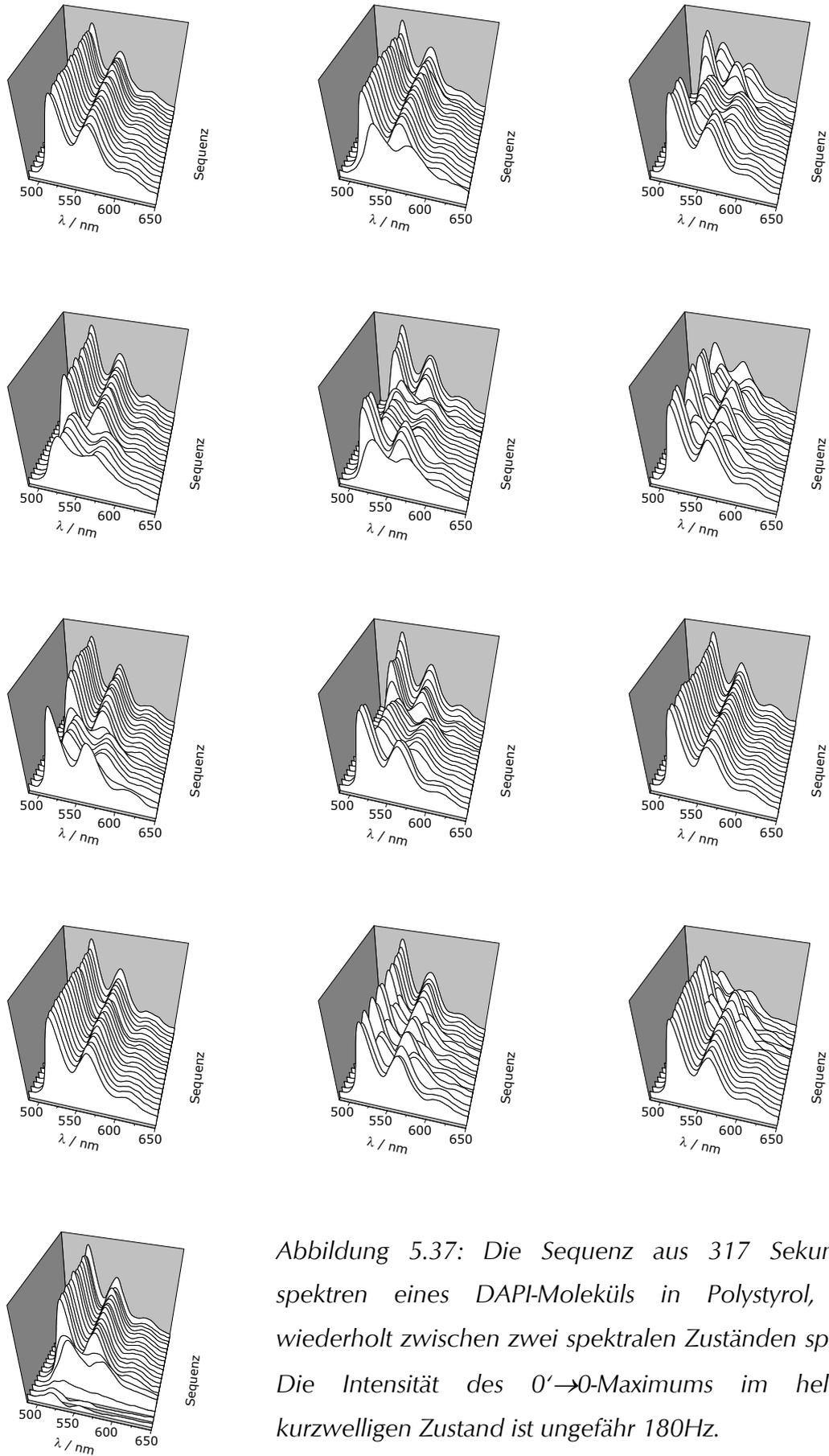
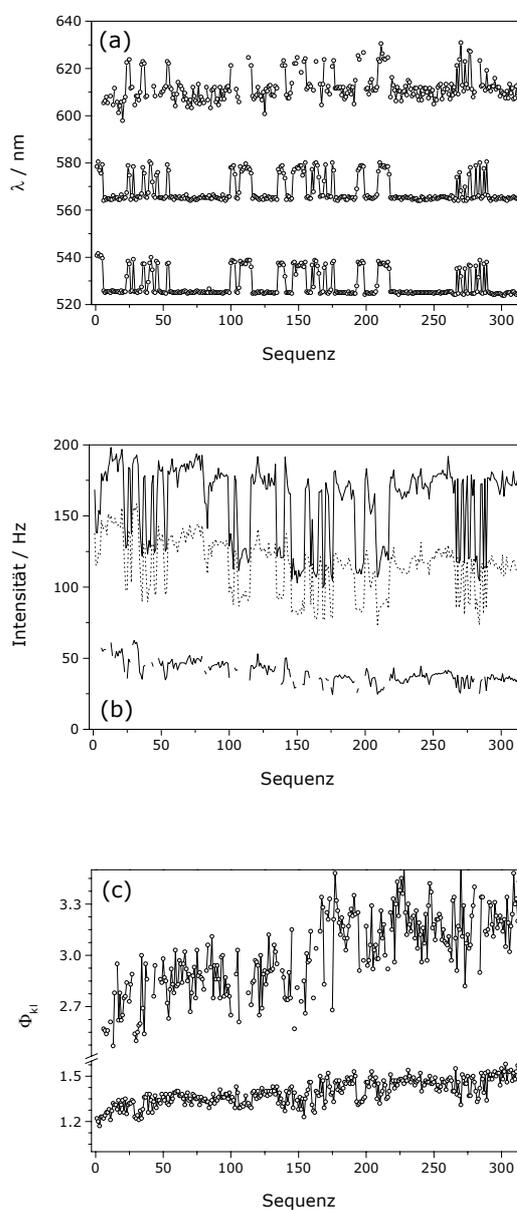


Abbildung 5.37: Die Sequenz aus 317 Sekunden-spektren eines DAPI-Moleküls in Polystyrol, daß wiederholt zwischen zwei spektralen Zuständen springt. Die Intensität des  $0' \rightarrow 0$ -Maximums im helleren kurzwelligeren Zustand ist ungefähr 180Hz.

Zunächst soll die Ausprägung des Übergangs in den Begriffen von Abschnitt 2.3.2 klassifiziert werden. Dazu werden die Trajektorien der relevanten spektralen Kenngrößen  $\lambda_{\max}$ ,  $I_{\max}$  und  $\Phi_{kl}$  gebildet (Abbildung 5.38). Da die spektrale Auflösung der Schwingungsfeinstruktur nicht automatisch protokolliert wird, muß die Veränderung dieser Größe zwischen den Zuständen abgeschätzt werden. Dazu wird jeweils ein typisches Spektrum der beiden Zustände durch Anfitzen von Gaußkurven analysiert. Für den intensiveren Zustand ergeben sich vibronische Bandweiten von 19, 31 und 30nm, für den weniger Intensiven 26, 30 und 62nm. Der hellere Zustand zeigt also eine höhere Auflösung der Schwingungsprogression, die spektrale Verschiebung wird daher von einem deutlichen S4-Effekt begleitet.

Abbildung 5.38: Trajektorien der spektralen Kenngrößen. (a) Die Trajektorien der Bandenmaxima  $\lambda_{\max}$  zeigen jeweils deutlich zwei bevorzugte spektrale Lagen, während die Abstände in der Schwingungsprogression für beide Zustände im wesentlichen gleich bleiben. Der beobachtete Sprung zeigt daher S1-, jedoch keine S3-Eigenschaften. (b) Die Trajektorie der Bandenintensitäten weist zu den spektralen Sprüngen simultane Intensitätssprünge auf. Auffällig ist die kontinuierliche Abnahme der Intensität mit der Zeit bei beiden Erscheinungsformen. (c) Die Bandenverhältnisse  $\Phi_{kl}$  der beiden Zustände sind nicht signifikant unterschiedlich. Der Übergang hat somit keine S2-Eigenschaften. Jedoch ist eine kontinuierliche Zunahme von  $\Phi_{kl}$  mit der Zeit zu beobachten.



Die Auswertung der Trajektorien der Sequenz offenbaren einen Übergang, der sich auf die spektrale Lage des gesamten Spektrums (S1), nicht aber auf das Verhältnis der Bandenintensitäten (S2) auswirkt. Dementsprechend ändert sich bei den beobachteten Sprüngen der  $S_1$ - $S_0$ -Abstand, nicht aber das Verhältnis der Franck-Condon-Faktoren in der Schwingungsfeinstruktur. Weiterhin werden durch einen Sprung zwischen den Zuständen die Fluoreszenzrate (I) und die Auflösung der vibronischen Progression (S4) stark beeinflusst. Nach der hier eingeführten Nomenklatur ist die untersuchte Dynamik also als [S1/ S4/ I]-Übergangsprozeß zu klassifizieren. Die leichten, kontinuierlichen Änderungen der Intensitäten und der Bandenverhältnisse könnten durch langsame mechanische Veränderungen im umgebenden Polymer und geringfügige Orientierungsveränderungen des Farbstoffmoleküls hervorgerufen werden.

Nachdem zuvor die Erscheinungsform der beobachteten Dynamik diskutiert wurde, soll nun deren kinetisches Verhalten untersucht werden. Dazu wird die Wellenlängentrajektorie des  $0' \rightarrow 0$ -Schwingungsbande ausgewertet. Diese erlaubt im Rahmen der zeitlichen Auflösung eine Zuordnung der Observablen zu den beiden Zuständen, sowie eine eindeutige Unterscheidung der Sprünge von Rauscheffekten. Das innerhalb der photochemischen Lebenszeit des Moleküls 54 Sprünge festgestellt wurden, bedeutet, daß jeder der beiden Zustände 27 mal eingenommen wurde. Das ist eine sehr geringe Anzahl für die Ermittlung von Lebensdauern durch Anfitzen exponentieller Abfälle an Histogramme von Aufenthaltsdauern (Abbildung 5.39). Die durch dieses Verfahren gewonnenen Resultate sind daher mit einer beträchtlichen Unsicherheit behaftet.

Sind die Lebensdauern  $\tau_i$  beider Zustände bekannt, ergeben sich zwangsläufig die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten  $P_i$  des Moleküls in diesen Zuständen. Deren Verhältnis  $K_{i \rightarrow j}$  ist das Einzelmolekülanalogon einer Gleichgewichtskonstante:

$$\frac{\tau_1}{\tau_2} = \frac{k_{2 \rightarrow 1}}{k_{1 \rightarrow 2}} = \frac{P_1}{P_2} = K_{2 \rightarrow 1} \quad (5.5)$$

Das Verhältnis der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten ist ebenso direkt aus der Verteilungsfunktion der spektralen Kenngrößen zugänglich (Abbildung 5.40). Die Kenntnis von  $K_{2 \rightarrow 1}$  erlaubt die Angabe der freien Übergangsenthalpie  $\Delta G_{2 \rightarrow 1}^0$ . Es

soll hier noch einmal ins Gedächtnis gerufen werden, daß alle diese quantitativen Aussagen auf einer sehr bescheidenen Datenlage basieren und eher exemplarischen Wert haben. Tabelle 5-5 faßt die Resultate zusammen.

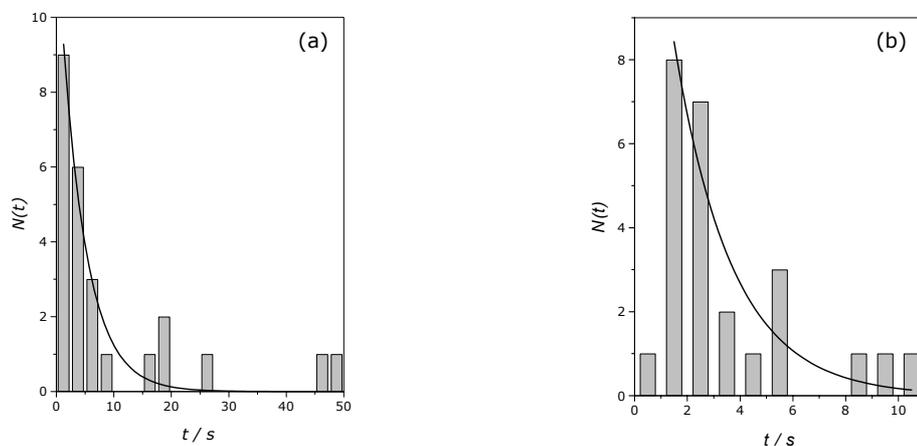


Abbildung 5.39: Histogramme der Aufenthaltsdauern in den Zuständen mit  $\lambda_0 \approx 525\text{nm}$  (a) und  $\lambda_0 \approx 540\text{nm}$  (b). Das Anpassen exponentieller Abfälle liefert für (a) eine Lebensdauer  $\tau_1 = 4,3 \pm 0,6\text{s}$  und für (b)  $\tau_2 = 2,2 \pm 0,5\text{s}$ . Aufenthaltsdauern unterhalb 1s liegen unterhalb der zeitlichen Auflösungsgrenze und sind praktisch nicht auffindbar. Die Histogramme können im Bereich kurzer Aufenthaltsdauern daher deutlich verfälscht sein und die resultierenden Lebensdauern beeinflussen. Unter (b) wurde  $N(t < 1\text{s})$  deshalb nicht in den Fit einbezogen.

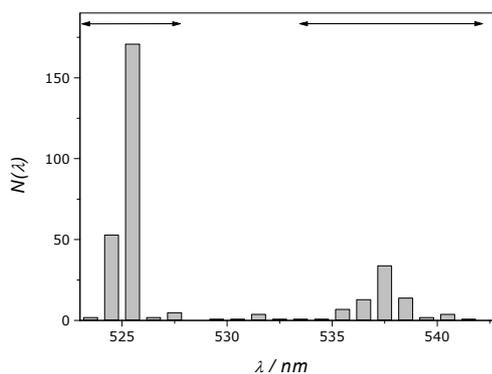


Abbildung 5.40: Verteilungsfunktion der Wellenlänge des kurzweiligsten Fluoreszenzbandenmaximums  $\lambda_0$ . Die Meßwerte innerhalb der durch die Pfeile gekennzeichneten Bereiche werden den beiden Zuständen zugeordnet. Insgesamt verbrachte das Molekül  $\sim 233\text{s}$  in Zustand 1 und  $\sim 76\text{s}$  in Zustand 2.

Kinetische Parameter aus ...	... exponentiellem Fit über $N(t)$ (Abbildung 5.39)	... Histogramm der $\lambda_0$ (Abbildung 5.40)
$\tau_1$	$4,3 \pm 0,6s$	-
$\tau_2$	$2,2 \pm 0,5s$	-
$k_{1 \rightarrow 2}$	$0,23 \pm 0,12s^{-1}$	-
$k_{2 \rightarrow 1}$	$0,46 \pm 0,03s^{-1}$	-
$P_1$	-	0,75
$P_2$	-	0,25
$K_{1 \rightarrow 2}$	$0,51 \pm 0,05$	0,33
$\Delta G_{1 \rightarrow 2}^0$	$1,67 \pm 0,24kJ/mol$	2,75kJ/mol

Tabelle 5-5: Zusammenstellung der kinetischen Parameter, die auf verschiedene Weise aus der beobachteten Sequenz bestimmt wurden. Die Fehler der aus den exponentiellen Fits ermittelten Größen wurden per Fehlerfortpflanzung aus den Standardabweichungen der Fits bestimmt. Für die Werte aus dem Histogramm der spektralen Lagen  $N(\lambda_0)$  wurden keine Fehler abgeschätzt. Für die Ermittlung von  $\Delta G^0$  wurde eine Temperatur von 20°C angenommen. Die Aufheizung der molekularen Umgebung des Chromophors durch die absorbierte Anregungsleistung ist zu vernachlässigen (siehe dazu Appendix 7.3).

Die Abweichungen zwischen den Gleichgewichtsdaten, die durch Auswertung von Aufenthaltsdauer-, respektive Wellenlängenhistogramm ermittelt wurden, sind augenfällig. Diese sind unter Beachtung der Datenlage nicht verwunderlich. Zudem entspricht die Annahme eines einfachen monoexponentiellen Verhaltens für die Verteilung der Aufenthaltsdauern nicht auch zwangsläufig der Realität.

Eine darüber hinausgehende Fragestellung bezüglich des kinetischen Verhaltens, deren Diskussion durch die Betrachtung einzelner Moleküle zugänglich ist, behandelt die zeitliche Entwicklung der Übergangswahrscheinlichkeiten  $k_{i \rightarrow j}$ . Treten also die Sprünge zeitlich zufallsverteilt auf? Sind zu bestimmten Zeitpunkten Sprunghäufungen, beziehungsweise -verringerungen zu beobachten, oder ist die Sprunghäufigkeit nahezu gleichverteilt? Dazu werden die zeitlichen Koinzidenzen der Sprünge gemäß Abschnitt 2.5.3 ausgewertet. Es wird also die gemessene Verteilung eines Phänomens mit der theoretisch Vorausberechneten verglichen.

Zunächst muß definiert werden, wodurch das abzuzählende Phänomen charakterisiert wird. Hier sollen zwei Fälle diskutiert werden: Die zeitliche Verteilung der Sprünge ohne Rücksicht auf deren Vorzeichen (also  $1 \rightarrow 2$  und  $2 \rightarrow 1$ ) und die zeitliche Verteilung der Aufenthalte in Zustand 2 (Abbildung 5.41). Die gemeinsame Auswertung der Hin- und Rücksprünge ist eigentlich physikalisch nicht sinnvoll, zumal die jeweiligen Übergangswahrscheinlichkeiten  $k_{i \rightarrow j}$  nicht identisch sind (siehe Tabelle 5-5). Dennoch soll diese Auswertung zu Vergleichszwecken durchgeführt werden. Die Auswertung der Aufenthalte erfolgt auf zwei Arten: (1) Die Zeit wird unabhängig vom eingenommenen Zustand weiter gezählt (Abbildung 5.42). (2) Während Zustand 2 eingenommen wird, wird die Zeit nicht weiter gezählt (Abbildung 5.43). Die Gesamtzahl der Zeitintervalle sind daher bei diesen beiden Methoden unterschiedlich. Als Ereignis gilt in beiden Fällen der Sprung  $1 \rightarrow 2$ . Die so erhaltenen Verteilungsfunktionen und die bei zufälliger Abfolge unter gleichen Randbedingungen gültigen Poisson-Verteilungen sind nachfolgend dargestellt.

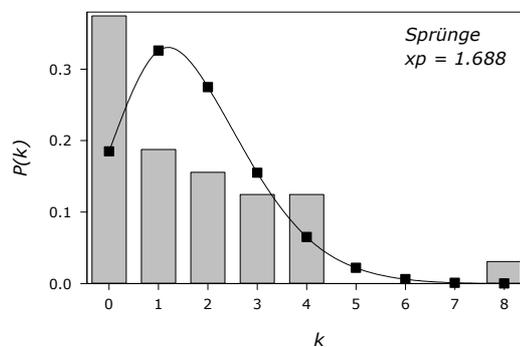


Abbildung 5.41: Koinzidenzanalyse der Sprünge  $1 \rightarrow 2$  und  $2 \rightarrow 1$ . Die Balken bezeichnen die Meßwerte, die Linie die zugehörige Poissonverteilung. Intervallbreite  $x = 10$  Spektren, Gesamtzahl der Intervalle: 32, Gesamtzahl der Ereignisse: 54  $\rightarrow$  mittlere Ereignisdichte  $p = 0,1688/\text{Spektrum}$ . Die Beobachtungszahlen um  $k = 0$  und  $k \gg xp$  sind auf Kosten der Werte um  $k = xp$  gegenüber der Poissonverteilung erhöht. Das betrachtete Phänomen tritt also kumuliert auf (siehe auch Abbildung 2.18 a). Die gemeinsame Auswertung der beider Sprungrichtungen ist in der Regel (so auch hier) nicht zulässig, da die beteiligten Zustände unterschiedliche Lebensdauern  $\tau_i$  und Aufenthaltswahrscheinlichkeiten  $P_i$  besitzen.

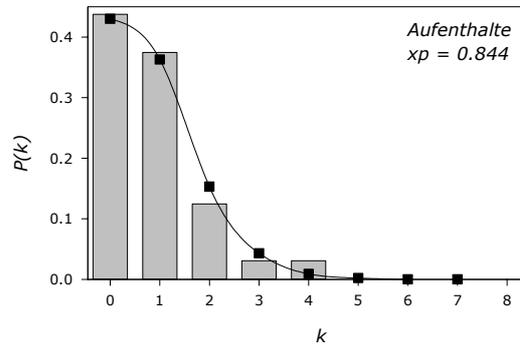


Abbildung 5.42: Koinzidenzanalyse der Aufenthalte in Zustand 2 ohne Korrektur der Intervalle um die Aufenthaltsdauer in diesem Zustand. Intervallbreite  $x = 10$  Spektren, Gesamtzahl der Intervalle: 32, Gesamtzahl der Ereignisse: 27  $\rightarrow$  mittlere Ereignisdichte  $p = 0,0844/\text{Spektrum}$ . Die Beobachtungszahlen liegen dicht an der Poissonverteilung. Nach der hier benutzten Definition des Phänomens tritt dieses somit annähernd zufallsverteilt auf.

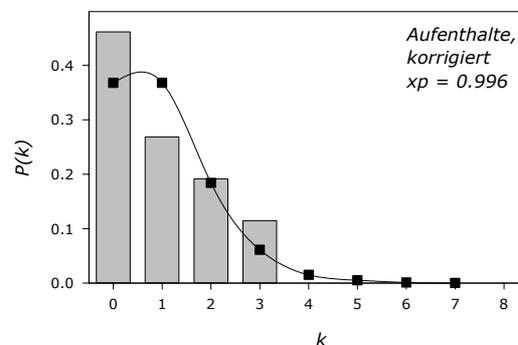


Abbildung 5.43: Koinzidenzanalyse der Aufenthalte in Zustand 2 mit Korrektur der Intervalle um die Aufenthaltsdauer in diesem Zustand. Intervallbreite  $x = 10$  Spektren, Gesamtzahl der Intervalle: 26, Gesamtzahl der Ereignisse: 26  $\rightarrow$  mittlere Ereignisdichte  $p = 0,0996/\text{Spektrum}$ . Die Beobachtungszahlen um  $k = 0$  und  $k \gg xp$  sind wieder leicht auf Kosten der Werte um  $k = xp$  gegenüber der Poissonverteilung erhöht. Das betrachtete Phänomen tritt also wiederum leicht kumuliert auf.

Wie bereits oben angeführt wurde, ist die Auswertung der Hin- und Rücksprünge als ein und dasselbe Phänomen (wie in Abbildung 5.41) nicht zulässig. Sinnvoll

wäre dieses Verfahren nur, wenn die kinetischen Eigenschaften beider Zustände identisch sind und die Sprünge zwischen diesen den desselben Mechanismus als Ursache haben. Da das im betrachteten Fall nicht zutrifft, bleibt nur, den gesamten Aufenthalt des Moleküls in einem Zustand als Ereignis zu zählen. Wird vermutet, daß der den abweichenden Zustand verursachende (extrinsische) Mechanismus auch wirksam ist, während sich das Farbstoffmolekül in eben diesem abweichenden Zustand befindet, ist es sinnvoll, die Zeit auch während dieses Aufenthalts weiterzuzählen (wie in Abbildung 5.42). Ist der verursachende Mechanismus an den Ausgangszustand geknüpft, liegt es nahe, die Aufenthaltsdauern im abweichenden Zustand nicht mitzuzählen (wie in Abbildung 5.43). Welcher der beiden Fälle hier vorliegt, ist nicht zu entscheiden.

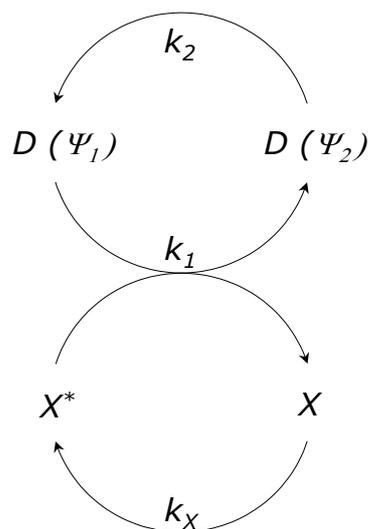


Abbildung 5.44: Ein hypothetisches Reaktionsschema für ein Farbstoffmolekül  $D$ , das durch einen extrinsischen Prozeß in den spektral abweichenden Zustand  $\Psi_2$  gebracht wird. Die Relaxationen von  $D(\Psi_2)$  und  $X^*$  sind voneinander unabhängig. Ist nun  $k_X \ll k_2$  und  $k_1$ , wird die Relaxation von  $X^*$  zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Dieser ist nicht vom Zustand des Farbstoffmoleküls abhängig. In diesem Fall wäre die durchgehende Zeitmessung wie unter Abbildung 5.42 korrekt. Im gegenteiligen Fall mit  $k_X \gg k_2$  und  $k_1$  ist der Zustand des Farbstoffmoleküls entscheidend, da erst nach dem Rücksprung in den Ausgangszustand die Wahrscheinlichkeit für einen erneuten Hinsprung wieder ansteigt. Hier wäre eine korrigierte Zeitmessung wie unter Abbildung 5.43 korrekt.

### 5.2.5.2 Diffusion

Die zur Auswertung von Diffusionsprozessen ausgewählte DAPI-Sequenz zeigt 224 Sekundenspektren, bevor die endgültige Photozerstörung des Farbstoffmoleküls eintritt. Die Diffusionsprozesse scheinen in dieser Sequenz durch Intensitätssprünge überlagert zu sein, die aber offenbar nicht mit spektralen Effekten korreliert sind. Die komplette molekulare Sequenz ist in Abbildung 5.45 dargestellt, unterteilt in 25-Spektren-Serien.

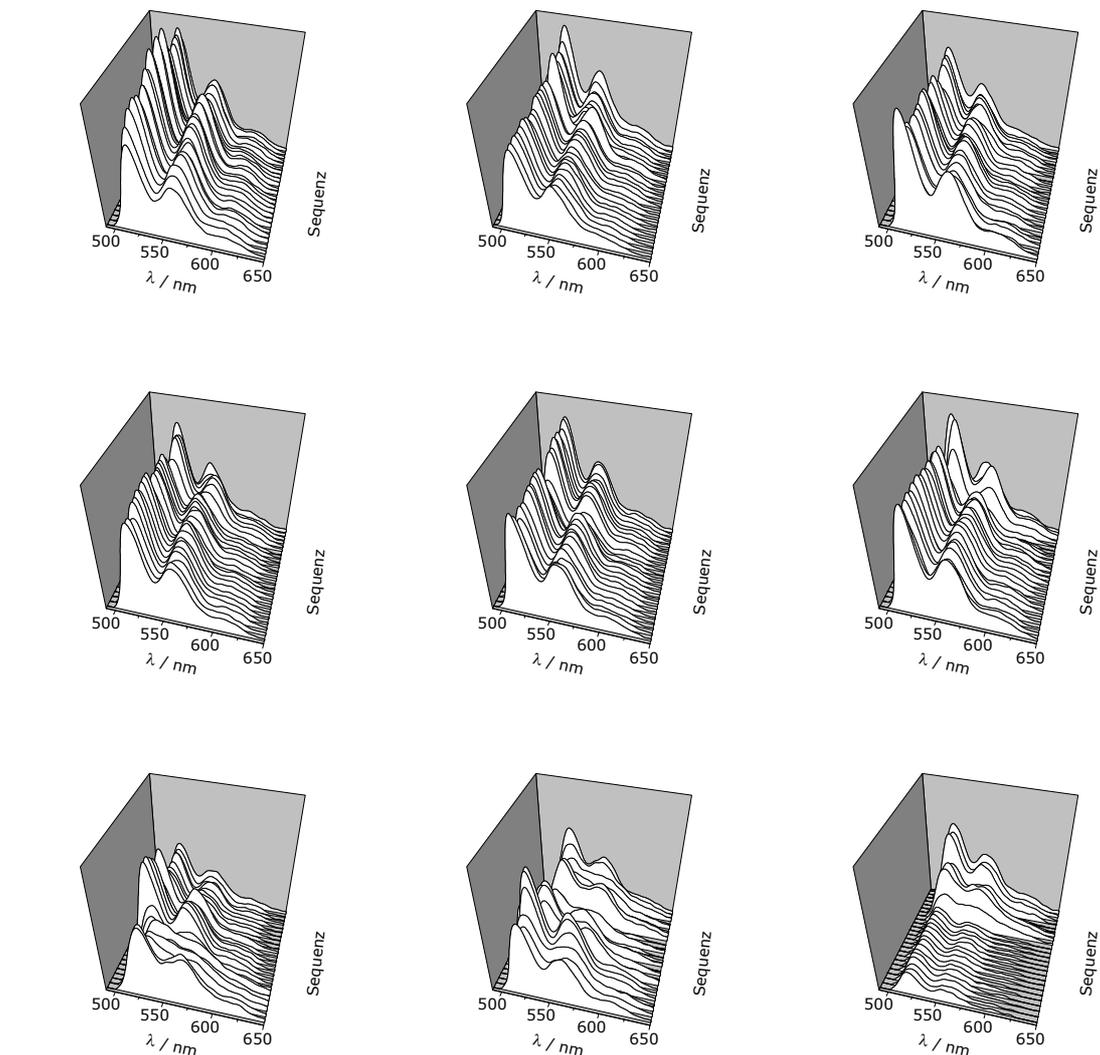
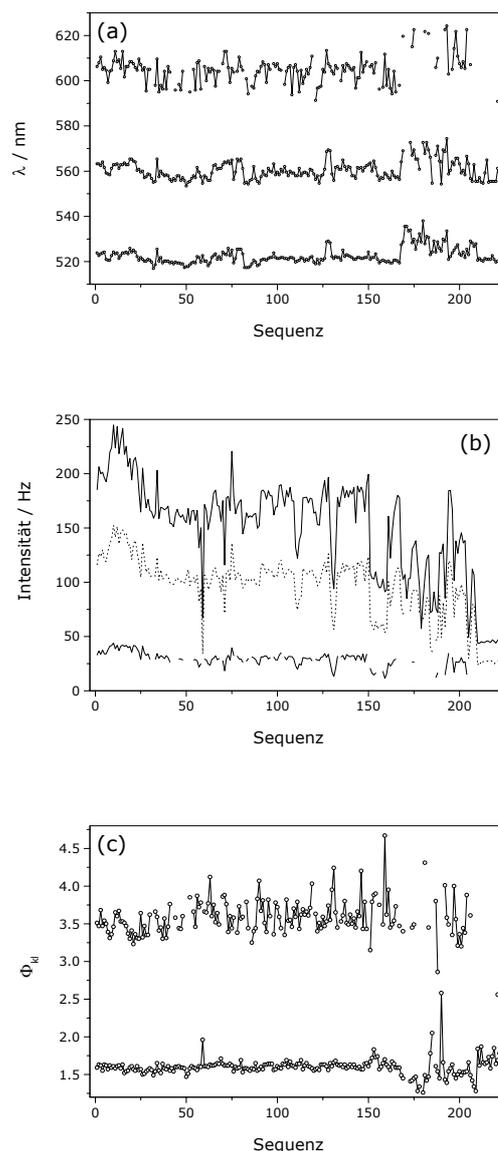


Abbildung 5.45: Die Sequenz aus 224 Spektren eines DAPI-Moleküls in Polystyrol, das Diffusionsverhalten in den verschiedenen spektralen Kenngrößen zeigt. Die intensivsten Spektren zeigen Fluoreszenzraten um 250Hz.

Während bei Übergängen eine Klassifikation der spektralen Ausprägung leicht fällt, ist für die Diffusion nicht sofort offensichtlich, ob Fluktuationen verschiedener Parameter durch denselben Prozeß verursacht werden, oder ob es sich um voneinander unabhängige Diffusionsprozesse handelt. Um dies zu entscheiden, werden die Trajektorien der interessierenden Größen  $\lambda_{\max}$ ,  $I_{\max}$  und  $\Phi_{kl}$  betrachtet, sowie deren gegenseitige Auftragung auf Korrelationen untersucht.

Abbildung 5.46: Trajektorien der spektralen Kenngrößen. (a) Die Trajektorien der Bandenmaxima  $\lambda_{\max}$  zeigen deutlich simultane Verschiebung. Der beobachtete Diffusionsprozeß zeigt daher S1-, jedoch keine S3-Eigenschaften. (b) Die Trajektorie der Bandenintensitäten  $I_{\max}$  zeigt Intensitätssprünge („Blinking“) neben verschieden ausgeprägter Intensitätsdiffusion. In wie weit die beobachteten I-Effekte mit spektralen Fluktuationen gekoppelt sind, wird in dieser Darstellung nicht endgültig deutlich. (c) Das Bandenverhältniss  $\Phi_{kl}$  bleibt bis zum 150. Spektrum weitgehend konstant, um dann spontane Schwankungen und Tendenzen über große Zahlen von Spektren ( $> 50$ ) zu zeigen. Ob eine Kopplung zu den Fluktuationen der anderen Parametern vorliegt, kann auch hier nicht sicher beantwortet werden.



Bis hierhin kann Diffusion nach dem I-, S1-, und in sehr geringem Umfang nach dem S2-Typ festgestellt werden, nicht aber S3-Diffusion. S4-Effekte scheinen die Intensitätssprünge zu begleiten, nicht aber die Diffusionsprozesse der spektralen Parameter (Abbildung 5.45).

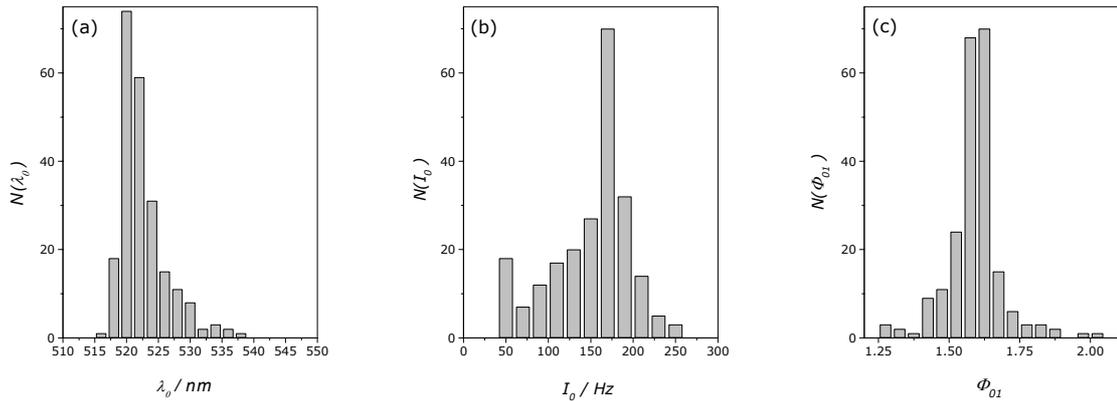


Abbildung 5.47: Verteilungsfunktionen der betrachteten Größen. (a) Die spektrale Lage ist monomodal, aber stark unsymmetrisch verteilt. (b) Die Verteilung der Intensität ist auf Grund der verschiedenen Schwankungstypen (Übergänge, Diffusion mit verschiedenen Zeitkonstanten und Amplituden) wenig aussagekräftig. (c) Die Verhältnisse der Bandenintensitäten sind symmetrisch um 1,6 verteilt. Die Werte bei  $\sim 1,3$  und  $\sim 2,0$  werden durch die starken Schwankungen nach dem 150. Spektrum verursacht.

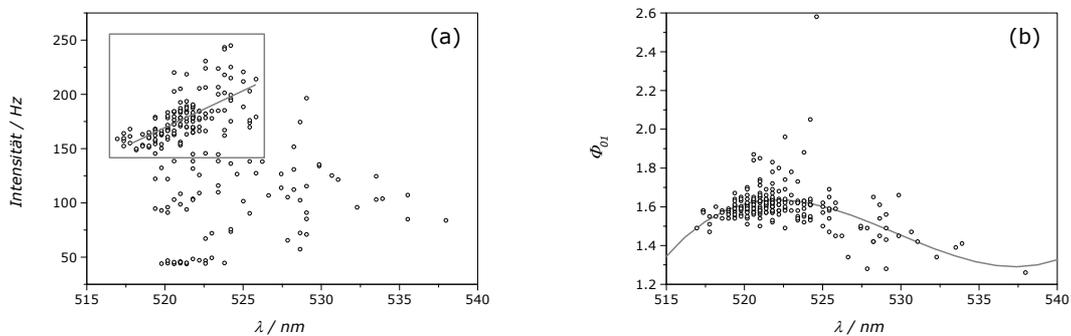


Abbildung 5.48: Gegenseitige Auftragung der spektralen Kenngrößen zum Auffinden von Korrelationen. (a) Die Intensität der  $0' \rightarrow 0$ -Bande  $I_0$  als Funktion deren spektraler Lage  $\lambda_0$ . Im Bereich der intensiven, kurzwelligen Spektren ist eine leichte positive Korrelation zu verzeichnen. Die übrigen Datenpunkte sind weiträumig und unkorreliert verteilt. (b) Das Intensitätsverhältnis der  $0' \rightarrow 0$ - zur  $0' \rightarrow 1$ -Bande  $\Phi_{01}$  als Funktion deren spektraler Lage  $\lambda_0$ . Bis auf einige Ausreißer ordnen sich alle Datenpunkte weitläufig um eine flache Kurve (Hier angenähert durch ein Polynom 3. Grades). Wiederum ist also eine leichte Korrelation feststellbar.

Nach Betrachtung von Abbildung 5.48 ist nun zumindest eine Klassifizierung des Diffusionsverhaltens in der hier untersuchten Sequenz möglich. Die sowohl mit den Intensitäts-, als auch den Bandenverhältnisfluktuationen korrelierten Schwankungen der spektralen Lage für die intensiven Spektren sind vom {S1/ S2 /I }-Typ. Darüber hinaus zeigt das Molekül starke, eventuell sprungartige Schwankungen der Intensität, die unsystematisch mit Fluktuationen von spektraler Lage und Bandenverhältnis einhergehen.

Die kinetischen Eigenschaften von Diffusionsprozessen lassen sich bequem aus den Autokorrelationskurven der fluktuierenden Größen bestimmen, wenn der der Diffusion zugrundeliegende Mechanismus aufgeklärt und die zugehörige theoretische Autokorrelationsfunktion bekannt ist. Die Intensitätstrajektorien einzelner Moleküle wurden beispielsweise von Tietz et. al. per Autokorrelation ausgewertet [40], die Trajektorie des spektralen Schwerpunkts eines Einzelmoleküls von Xie [41]. Liegt jedoch der Hintergrund eines Diffusionsvorgangs im Dunkeln, oder überlagern sich mehrere dynamische Prozesse, so lassen sich aus den Autokorrelationsfunktionen der fluktuierenden Parameter weder qualitative noch quantitative Schlüsse ziehen. Dies ist auch hier der Fall. Die komplexen Kurvenverläufe der experimentell ermittelten Autokorrelationsfunktionen

$$g_{\lambda}^*(\tau) = \frac{1}{g_{\lambda}^*(0)} \cdot \int \Delta\lambda(t) \cdot \Delta\lambda(t + \tau) dt \quad (5.6)$$

und

$$g_{I}^*(\tau) = \frac{1}{g_{I}^*(0)} \cdot \int \Delta I(t) \cdot \Delta I(t + \tau) dt \quad (5.7)$$

lassen sich nicht sinnvoll durch Modellkurven aus der Literatur annähern (Abbildung 5.49). Für die Auswertung der betrachteten Sequenz ist die Autokorrelationsanalyse daher kein gangbarer Weg.

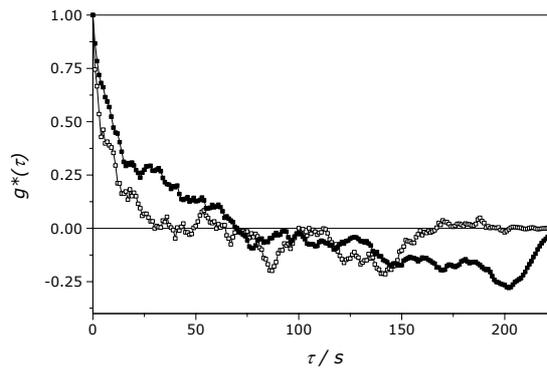
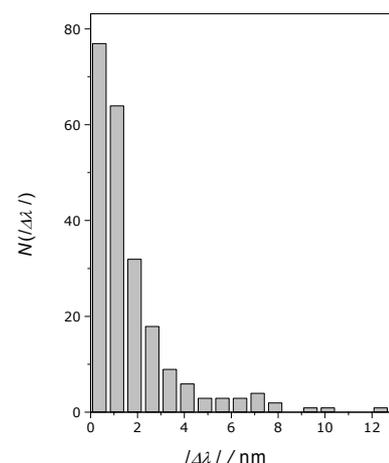


Abbildung 5.49: Normierte Autokorrelationsfunktionen zur untersuchten Sequenz. Schwarze Symbole: Ausgewertete Größe ist die Abweichung der Intensität vom Mittelwert der Sequenz  $\Delta I$ . Offene Symbole: Ausgewertete Größe ist die Abweichung der Wellenlänge des  $0' \rightarrow 0$ -Maximums vom Mittelwert der Sequenz  $\Delta \lambda$ .

Es bleibt die Betrachtung der Abweichungen in den Parametern aufeinanderfolgender Spektren (Der Begriff „Sprungweite“ ist irreführend und wird deshalb vermieden). Als einzige in diesem Fall geeignete Größe erscheint die spektrale Lage, da diese nicht all zu sehr von den Intensitätssprüngen beeinflusst wird, jedoch weitaus deutlicher fluktuiert als das Verhältnis der Bandenintensitäten. Abbildung 5.50 zeigt das Histogramm dieser Abweichungen.

Abbildung 5.50: Verteilungsfunktion über die Verschiebungen der spektralen Lage des  $0' \rightarrow 0$ -Maximums zwischen zwei aufeinanderfolgenden Spektren (als Betrag, Schrittweite:  $0,75\text{nm}$ ). Das Absinken der Häufigkeit mit steigendem  $|\Delta \lambda|$  gleicht einem exponentiellen Abfall, jedoch ist dafür der Wert  $N(0-0,75\text{nm})$  deutlich zu niedrig.



### 5.2.6 Zusammenfassung

Das vorangegangene Kapitel behandelte die statistische Analyse der einzelmolekülspektroskopischen Experimente bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{EX}} = 488\text{nm}$ . Im Gegensatz zu der vorher eingesetzten Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$  war nun das gesamte inhomogene Fluoreszenzprofil der eingesetzten Farbstoffe, insbesondere PI und DAPI, zugänglich und somit eine repräsentative statistische Auswertung der Meßresultate. Um zu überprüfen, ob die in die Untersuchung eingeflossenen Moleküle einen repräsentativen Querschnitt des Ensembles darstellen, wurden Einzelmolekülspektren summiert und mit dem Ensemblefluoreszenzspektrum unter entsprechenden Bedingungen verglichen. Dabei wurde eine zufriedenstellende Übereinstimmung für alle Farbstoffe (PI, DAPI, PIBr<sub>3</sub>) festgestellt.

Zunächst wurden die Verteilungsfunktionen der spektralen Zustandsgrößen  $\lambda_0$ ,  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\Delta\nu_{01}$ ,  $\Delta\nu_{12}$  und  $\Phi_{01}$  für die Ensemble der untersuchten Farbstoffe gebildet und diskutiert. Während die energetischen Abstände der Schwingungsstruktur  $\Delta\nu_{ki}$  und die Quotienten der Schwingungsbandenintensitäten  $\Phi_{01}$  lediglich die für eine amorphe Umgebung zu erwartende inhomogene Streuung zeigen, treten bei der spektralen Position der Schwingungsbandenmaxima  $\lambda_{\text{max}}$  signifikante Häufungen in Erscheinung, die den Zerfall des Ensembles in spektrale Subensembles belegen. Die Trennung dieser Subensembles ist dabei für PI deutlich ausgeprägter als für DAPI.

Um Korrelationen zwischen den Zustandsgrößen der Einzelmolekülspektren trotz deren erheblicher Streuung aufzudecken, wurden Intervallmittelwerte gebildet. Zwischen der Intensität der 0'→0-Bande und deren Wellenlänge  $\lambda_0$  ergeben sich komplexe Zusammenhänge für PI und DAPI. Das lokale Minimum im Fall von PI läßt sich dabei hervorragend durch die verminderte Anregung zwischen 0→0'- und 0→1'-Bande im Absorptionsspektrum deuten. Die Korrelation zwischen dem Intensitätsverhältnis  $\Phi_{01}$  und  $\lambda_0$  ist bei beiden Farbstoffen vergleichsweise einfach, jedoch gegenläufig: Für PI ist ein leichter Anstieg von  $\Phi_{01}$  mit  $\lambda_0$  zu verzeichnen, für DAPI ein deutliches Absinken.

Bei der Untersuchung der spektralen Dynamik und der sie beschreibenden Prozeßgrößen wurden Diffusions- und Übergangsprozesse separat betrachtet. Besondere Beachtung galt dabei Molekülen mit korreliert fluktuierenden Parametern. So fand sich bei einer großen Zahl von Molekülen beider Farbstoffe

eine Korrelation zwischen der Diffusion der spektralen Lage  $\lambda_0$  und der Intensität  $I_0$ . Die linearen Steigungskoeffizienten dieser Korrelationen erwiesen sich zudem als abhängig von der mittleren spektralen Lage  $\langle\lambda_0\rangle$ . Diese Beobachtungen ließen sich wiederum sehr gut mit den Änderungen des Absorptionsquerschnitts bei simultaner Diffusion des Absorptionsspektrums über die Anregungswellenlänge erklären. Aus diesen Überlegungen folgte für die ausgewerteten Moleküle eine mittlere Stokes-Verschiebung von  $\Delta\lambda = 12,3\text{nm}$  (PI) und  $\Delta\lambda = 13,2\text{nm}$  (DAPI). Bei der korrelierten Diffusion des Quotienten der Bandenintensitäten  $\Phi_{01}$  mit  $\lambda_0$  ergab sich für PI kein klares Bild, für DAPI zeichnete sich vorherrschend eine Abnahme von  $\Phi_{01}$  mit steigender  $\lambda_0$  ab. Dieser Befund deckt sich mit den Erkenntnissen über die Korrelation der Zustandsgrößen  $\lambda_0$  und  $\Phi_{01}$ . Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung von Übergängen zwischen Zuständen abweichender spektraler Lage  $\langle\lambda_0\rangle$  und abweichendem Intensitätsverhältnis  $\langle\Phi_{01}\rangle$  ([S1/ S2]-Sprünge): ein, auch durch die geringe Zahl an Beobachtungen, unklares Bild bei PI, ein deutliches Vorherrschen an Übergängen bei DAPI, deren kürzerwelliger Zustand das höhere  $\langle\Phi_{01}\rangle$  aufweist. Simultane Übergänge in der spektralen Lage  $\langle\lambda_0\rangle$  und der Intensität  $\langle I_0\rangle$  ([S1/ I]-Sprünge) dagegen zeigen keinerlei erkennbare Korrelation auf, weder für PI, noch für DAPI. Bei der Untersuchung der Verteilungsfunktionen über die Sprungweiten in der spektralen Position deutet sich keine Gruppierung um die Abstände der spektralen Subensemble des jeweiligen Farbstoffs an. Auch darüber hinaus sind keine signifikanten Häufungen augenfällig. Das deutet auf überwiegend extrinsische Ursachen für die beobachteten Sprungphänomene hin.

Abschließend wurden zwei, von ihrem Umfang und Verlauf besonders geeignete spektrale Sequenzen einer detaillierten Beschreibung, Klassifizierung und statistischen Analyse unterzogen, eine mit erheblicher Diffusion und eine mit einer ausgeprägten Übergangsdynamik.



## 6 Zusammenfassung & Ausblick

Die zeitaufgelöste Untersuchung der Fluoreszenzspektren von Perylenderivaten mit ausgeprägter Schwingungsstruktur an einem hochempfindlichen Einzelmolekülspektrometer offenbarte eine Vielzahl spektraler Erscheinungsformen und dynamischer Phänomene. Zu deren phänomenologischer Beschreibung und Klassifikation wurden Parameter mit direktem molekülphysikalischem Hintergrund benutzt:

- Die absolute spektrale Maximalage der Schwingungsbanden  $\nu_k$  spiegelt die Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand  $\Delta E(S_0-S_1)$  wider. Eine Änderung dieser Größe wurde als S1-Prozeß bezeichnet.
- Die absolute Intensität eines solchen Schwingungsmaximums  $I_k$  wird durch die Absorptionsquerschnitt  $\sigma$  des Moleküls bei  $\lambda_{EX}$ , die Fluoreszenzeffizienz  $\phi_{FL}$  und den Franck-Condon-Faktor  $F_k^2$  bestimmt. Eine Änderung der Intensität wurde als I-Prozeß bezeichnet.
- Das Verhältnis der Intensitäten verschiedener Schwingungsbanden  $\Phi_{kl}$  ist gleich dem Verhältnis der Franck-Condon-Faktoren.  $\Phi_{kl}$  ist eine Relativgröße mit innerem molekularem Bezug. Eine Änderung dieser Größe wurde als S2-Prozeß bezeichnet.
- Die spektralen Abstände in der Schwingungsprogression  $\Delta\nu_{kl}$  geben Auskunft über die Abfolge der vibronischen Niveaus im Grundzustand und somit über die Form des Potentialtopfs. Auch  $\Delta\nu_{kl}$  ist eine Relativgröße, deren Änderungen als S3-Prozesse bezeichnet wurden.

Diese Beschreibung läßt sich grundsätzlich auch auf die Spektren anderer Farbstoffe übertragen. Die genannten Parameter, sowie der spektrale Schwerpunkt und die integrale Intensität wurden durch eigens entwickelte Software für jedes Spektrum einer Sequenz ermittelt und protokolliert. Mit diesem Verfahren wurden für jeden Farbstoff eine umfangreiche Anzahl von Einzelmolekülspektren ausgewertet, die repräsentative Querschnitte der jeweiligen Ensembles darstellen. Anhand dieser Daten wurden detaillierte statistische Studien bezüglich der spektralen Zustandsgrößen und Dynamik durchgeführt:

- Die Verteilungsfunktionen aller Parameter (außer den Intensitäten) wurden für PI, DAPI und PIBr<sub>3</sub> gebildet. Die Histogramme über  $\Delta\nu_{01}$ ,  $\Delta\nu_{12}$  und  $\Phi_{01}$  zeigen

das monomodale Profil der inhomogenen Verbreiterung, während die Häufungen in der Verteilung der  $\nu_k$  das Vorliegen von Subensembeln anzeigt. Die Subensembelbildung ist dabei für PI deutlicher ausgeprägt als für DAPI. Die Verteilungsfunktionen der Parameter eröffnen dabei offensichtlich viel detailliertere und genauere Einblicke in die Eigenschaften der untersuchten Probe als die vergleichbare Ensemblemessung.

- Die spektralen Parameter wurden auf Korrelation untereinander überprüft. Zur Minimierung der Streuung wurden dabei Mittelwerte von Wellenlängenintervallen aufgetragen. Dabei zeigen sich im Fall der Gegenüberstellung von  $\lambda_0$  und  $\Phi_{01}$  ein signifikant unterschiedliches Verhalten bei PI und DAPI: Für PI zeigt sich ein leichter Anstieg von  $\Phi_{01}$  mit  $\lambda_0$ , für DAPI dagegen ein deutlicher Abfall. Der Zusammenhang zwischen  $\lambda_0$  und  $I_0$  ist für beide Farbstoffe deutlich komplexer. Im Fall von PI läßt sich der Verlauf der Korrelation durch die simultanen Versetzung des Absorptions- mit dem Fluoreszenzspektrums über die Anregungswellenlänge, und die dadurch unterschiedlichen Populationraten des  $S_1$ -Zustands verschiedener Moleküle erklären.
- Analoge Zusammenhänge wurden für Diffusionsprozesse innerhalb der einzelnen Sequenzen untersucht. Fand sich eine Korrelation zwischen den Parametern, so wurde der Steigungskoeffizient  $m_i$  ermittelt. Dieser wurde gegen die mittlere spektrale Lage  $\langle\lambda_0\rangle$  des diffundierenden Zustands aufgetragen. Bei dem Zusammenhang zwischen  $m_\Phi$ ,  $\langle\lambda_0\rangle$  und  $\langle\Phi_{01}\rangle$  ergeben sich für beide Farbstoffe Resultate, die mit den Ergebnissen der direkten Korrelation zwischen den Parametern konsistent sind. Die Zusammenhänge zwischen  $m_I$ ,  $\langle\lambda_0\rangle$  und  $\langle I_0\rangle$  lassen sich für beide Farbstoffe wiederum mit der simultanen Diffusion des Absorptions- mit dem Fluoreszenzspektrum über  $\lambda_{EX}$  und die sich damit verändernde Populationsrate des  $S_1$ -Zustands bei einem Molekül interpretieren.
- Die statistische Analyse der Übergangsprozesse zeigt grundsätzliche Unterschiede zu den Diffusionsprozessen. Weder die synchronen Sprünge von  $\lambda_0$  und  $I_0$ , noch die von  $\lambda_0$  und  $\Phi_{01}$ , zeigen augenfällige Korrelationen. Die Sprungweiten gruppieren sich nicht um die Distanzen zwischen den Subensembeln in den entsprechenden Verteilungsfunktionen. Das ist ein Beleg für überwiegend extrinsische Ursachen der übergangsartigen Dynamik, sowohl bei PI als auch bei DAPI.

Im Gegensatz zu den offensichtlich überwiegend extrinsisch verursachten Sprüngen bei PI und DAPI, wurde bei der Einzelmolekülspektroskopischen Untersuchung von API bei  $\lambda_{\text{EX}} = 514,5\text{nm}$  ein an vielen Molekülen wiederkehrendes Sprungphänomen mit  $\Delta\lambda_0 \approx 120\text{nm}$  beobachtet. Dieser spektrale Abstand entspricht ziemlich genau dem zweier Subensemble, und weiterhin zwei aus Ensembleexperimenten bekannten Phänotypen. Durch angepaßte Ensemblemessungen wurden die zwei Erscheinungsformen von API als Konformationsisomere identifiziert und in ihren Eigenschaften untersucht. Dies ist ein typischer Fall eines intrinsisch ausgelösten spektralen Sprungs. Leider läßt sich der langwellige Phänotyp von API nicht bei  $\lambda_{\text{EX}} = 488\text{nm}$  anregen, eine repräsentative statistische Analyse dieses Farbstoffs war daher nicht möglich.

Mit Bezug auf die Schwerpunkte und Ziele dieser Arbeit kann abschließend festgestellt werden:

- Es gelang eine phänomenologische Beschreibung und Klassifikation einzelmolekülspektroskopischer Erscheinungen zu formulieren, die prinzipiell auf alle Farbstoff/Matrix-Systeme übertragbar ist. In der Praxis ist deren Anwendbarkeit durch die (meßtechnisch oder physikalisch reale) Auflösung der Schwingungsfinestruktur in den Einzelmolekülspektren des jeweiligen Farbstoffs begrenzt.
- Für die Farbstoffe PI, DAPI und  $\text{PIBr}_3$  wurden individuelle Moleküle in großem Umfang spektroskopisch erfaßt. Es wurde sichergestellt, daß die jeweilige Auswahl an Molekülen einen repräsentativen Querschnitt der Gesamtheit darstellt. Die Erkenntnisse, die anhand der Auswertung dieser Querschnitte gewonnen werden, können mit großer Sicherheit als spezifisch für das untersuchte Farbstoff/Matrix-System angesehen werden und sollten daher reproduzierbar sein.
- Anhand der zur spektralen Beschreibung verwendeten Parameter wurden die repräsentativen Querschnitte detailliert statistisch ausgewertet. So wurden die Verteilungsfunktionen von Zustands- und Prozeßeigenschaften untersucht, diese Eigenschaften untereinander auf Korrelation überprüft und die Resultate zu einem Gesamtbild zusammengefügt.

- In einigen Fällen gelang darüber hinaus durch Vergleich mit Ergebnissen aus Ensembleexperimenten eine physikalische Interpretation der beobachteten Phänomene.
- Zu einer vollständigen und umfassenden phänomenologischen Beschreibung reichen die gewonnenen Erkenntnisse jedoch noch nicht. So wäre beispielsweise eine Einbeziehung von Intensitätstrajektorien in die statistische Analyse denkbar, die eine deutlich höhere zeitliche Auflösung erlauben. Dies wäre vor allem im Hinblick auf die Verteilung der mittleren absoluten Intensitäten der Moleküle von Interesse. Weiter Parameter könnten nach der Entwicklung angepaßter Software auf ihren Zusammenhang getestet werden. Eine noch breitere statistische Basis würde auch bei seltenen Sprungphänomenen gesicherte Aussagen ermöglichen. Gezielte Modifikationen an Farbstoff, Matrix und experimentellem Aufbau, sowie dementsprechend angepaßte Ensemblemessungen würden die Einflüsse bisher unbeachteter Parameter zugänglich machen. Diese Liste ließe sich beliebig fortsetzen, dies zu tun sei der Phantasie meiner Nachfolger überlassen.

## Conclusion & Outlook

The temporal observation of fluorescence spectra of perylene dyes showing a clear vibronic progression by means of a highly sensitive single molecule spectrometer revealed a multiplicity of spectral and dynamic phenomena. Description and classification of these phenomena was done using parameters with direct reference to molecular properties:

- The absolute spectral positions of the vibronic bands  $\nu_k$  gives the energetic distance between ground- and excited state  $\Delta E(S_0-S_1)$ . A shift in this quantity was termed S1-process.
- The absolute intensities of the vibronic bands  $I_k$  is determined by the molecule's absorption cross section  $\sigma$  at  $\lambda_{EX}$ , the fluorescence quantum yield  $\phi_{FL}$  and the Franck-Condon-Factor  $F^2$ . A shift in intensity was termed I-process.
- The ratio of the vibronic band intensities  $\Phi_{kl}$  equals the Ratio of the Franck-Condon-Factors of the respective transitions.  $\Phi_{kl}$  has an intrinsic molecular reference and is hence a relative parameter. A shift in  $\Phi_{kl}$  was called S2-process.
- The spectral distances in the vibronic fine structure  $\Delta\nu_{kl}$  reflect the sequence of vibronic levels in the ground state and hence the shape its potential well.  $\Delta\nu_{kl}$  is a relative parameter too, a shift in which is called S3-process.

This classification is in principle transferable on spectra of other dyes. The specified parameters plus the spectral mean and the integrated intensity were determined and recorded by adapted software for each spectrum of a sequence. By this method a large number of single molecule spectra were surveyed as a representative cross section for the dyes PI, DAPI and PIBr<sub>3</sub>. Detailed statistical Analysis was performed on these data:

- The distribution functions were formed for all recorded properties (except intensity). The histograms of  $\Delta\nu_{01}$ ,  $\Delta\nu_{12}$  and  $\Phi_{kl}$  exhibit the monomodal profile of inhomogeneous broadening, whereas the accumulations in the distribution of  $\nu_k$  indicates the existence of various subensembles. Obviously a histogram of single molecule data gives a more precise and detailed insight into the sample properties than a comparable ensemble measurement.

- The spectral parameters were checked for mutual correlation. In order to minimize scattering of the data average values of wavelength-bins were plotted. The correlation plot of  $\Phi_{01}$  against  $\lambda_0$  shows a significant difference between PI and DAPI: For PI a slight increase is visible, for DAPI an considerable decrease. The coherence between  $I_0$  and  $\lambda_0$  is more complex for both dyes. In the case of PI the correlation can be explained by the simultaneous shift of the absorption with the fluorescence spectrum over  $\lambda_{EX}$ , leading to different population rates in the  $S_1$ -state of different molecules.
- The same properties were checked for correlation in the spectral sequences of each molecule. For identified correlations of two diffusing parameters the slope  $m_i$  was determined and plotted against the average spectral position  $\langle\lambda_0\rangle$ . The relation between  $\langle\Phi_{01}\rangle$ ,  $m_\Phi$  and  $\langle\lambda_0\rangle$  is consistent with the results from the correlation of these quantities over all investigated molecules. The dependence of  $\langle I_0\rangle$  and  $m_i$  on  $\langle\lambda_0\rangle$  can again be interpreted as a simultaneous diffusion of fluorescence and absorption spectra over  $\lambda_{EX}$  and hence a varying population rate of the  $S_1$ -state of single PI- and DAPI-molecules.
- The statistical Analysis of transitional processes reveals basic differences to diffusional processes. Neither the synchronous jumps in  $\lambda_0$  and  $I_0$ , nor those of  $\lambda_0$  and  $\Phi_{01}$  exhibit a general correlation. The jumpwidths are not accumulated around the distances between the subensembles of the associated distribution. This is a strong hint for predominantly extrinsic origins of the transitional dynamics, for PI as well as for DAPI.

Opposed to the extrinsically caused jumps observed for PI and DAPI, single molecule spectral sequences of API with  $\lambda_{EX} = 514,5\text{nm}$  showed a jump of  $\Delta\lambda \approx 120\text{nm}$ , recurring uniformly at many dye molecules. This jumpwidth matches exactly the distance between two subensembles, and further two phenotypes of API, identified by adapted ensemble experiments as conformational isomers. This is a typical case of an intrinsically initiated jump. The excitation of the long wavelength form with  $\lambda_{EX} = 488\text{nm}$ , and therefor a representative statistical study of this dye was impossible.

Referring to the focal points of this work can be concluded:

- A phenomenological description and classification of single molecule spectral appearances was established, applicable to all well resolved dye/matrix-systems.

- 
- For PI, DAPI and PI<sub>Br</sub><sub>3</sub> a large number of individual molecules were studied spectroscopically. It was confirmed, that the selection of molecules to investigate in were a representative cross section of the ensemble. The conclusions drawn from the analysis of these cross sections can be considered as specific for the investigated sample, and hence as reproducible.
  - By means of the established spectral description the representative data were statistically analyzed. Results of different experiments were linked to give a general view.
  - In some cases a physical interpretation of the observed phenomena was found by comparison with ensemble experiments.
  - For a complete phenomenologic description still more investigations are necessary. Inclusion of intensity trajectory studies, providing higher temporal resolution, is an example, in particular with regard to the distribution of the average absolute intensities. Further properties could be checked for correlation by new software. A even wider statistical base could allow certain conclusions on rare jump phenomena. Specific modifications in the dye's structure, surrounding or the experimental setup, as well as adapted model experiments on ensemble level, would reveal influences of further parameters.



## 7 Appendix

### 7.1 Literaturverzeichnis

- [1] H. N. Russell: „Relations between the spectra and other characteristics of the stars“ *Nature* **93** (1914) 227, 252 & 281.
- [2] J. B. Hearnshaw, „The analysis of starlight“, Cambridge University Press, Cambridge, 1986.
- [3] J. B. Kaler: „Sterne und ihre Spektren“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
- [4] W. E. Moerner, L. Kador: „Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid“ *Phys. Rev. Lett.* **62** (1989) 2535.
- [5] E. Betzig, R. J. Chichester: „Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy“ *Science* **262** (1993) 1422.
- [6] M. Orrit, J. Bernhard: „Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a *p*-terphenyl crystal“ *Phys. Rev. Lett.* **65** (1990) 2716.
- [7] T. Basche, W. E. Moerner: „Optical modification of a single molecule in a solid“ *Nature* **355** (1991) 335.
- [8] A. Zumbusch, L. Fleury, R. Brown, J. Bernhard, M. Orrit: „Probing individual two-level systems in a polymer by correlation of single molecule fluorescence“ *Phys. Rev. Lett.* **70** (1993) 3584.
- [9] K. D. Weston, S. K. Buratto: „Millisecond intensity fluctuations of single molecules at room temperature“ *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 3635.
- [10] T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss: „Quantum jumps of single molecules at room temperature“ *Chem. Phys. Lett.* **271** (1997) 1.
- [11] J. Widengren, „Fluorescence correlation spectroscopy, photophysical aspects and applications“, Ph. D. Thesis, Karolinska Institute, Stockholm (1996).

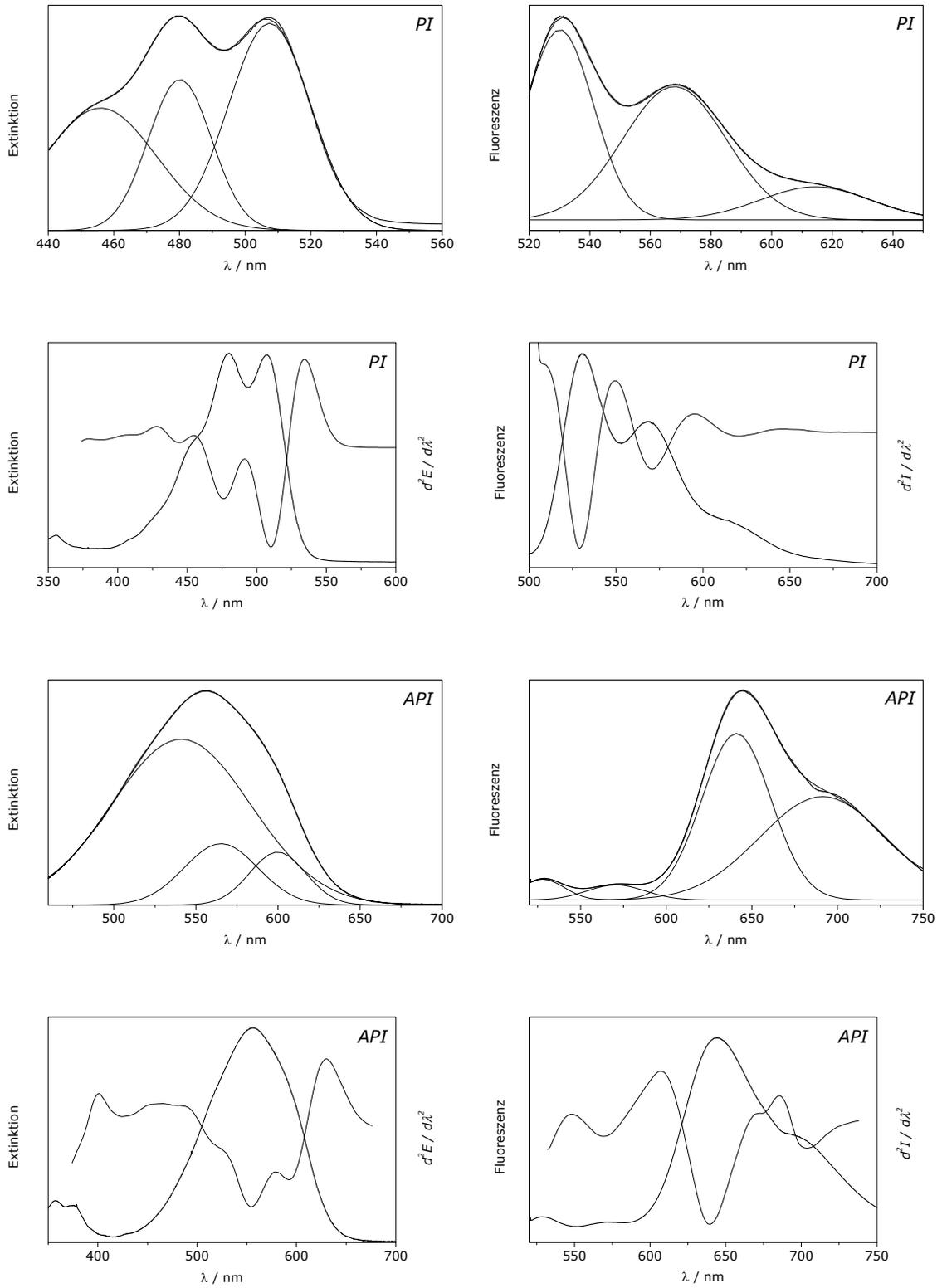
- 
- [12] M. A. Bopp, A. Sytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser: „The dynamics of structural deformations of immobilized single light-harvesting complexes“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 1271-11276.
- [13] E. Mei, A. M. Bardo, M. M. Collinson, D. A. Higgins: „Single molecule studies of Sol-Gel-derived films. Microenvironments and film-drying conditions“ *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 9973-9980.
- [14] Y. Hou, A. M. Bardo, C. Martinez, D. A. Higgins: „Characterization of molecular scale environments in polymer films by single molecule spectroscopy“ *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 212-219.
- [15] F. Köhn, J. Hofkens, F. C. DeSchryver: „Emission of the contact ion pair of rhodamine dyes observed by single molecule spectroscopy“ *Chem. Phys. Lett.* **321** (2000) 372.
- [16] C. Blum, F. Stracke, S. Becker, K. Müllen, A. J. Meixner: „Discrimination and interpretation of spectral phenomena by room temperature single molecule spectroscopy“ *J. Phys. Chem. A* **105** (2001) 6983.
- [17] T. Basche: „Fluorescence intensity fluctuations of single atoms, molecules and nanoparticles“ *J. Lumin.* **76 & 77** (1998) 263.
- [18] O. Panzer, W. Gohde, U. C. Fischer, H. Fuchs, K. Müllen: „Influence of oxygen on single molecule blinking“ *Adv. Mat.* **10** (1998) 1469.
- [19] T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss: „Single molecule Dynamics studied by polarization modulation“ *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3979.
- [20] A. G. T. Ruiter, J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, N. F. Van Hulst: „Single molecule rotational and transitional diffusion observed by near field scanning optical microscopy“ *J. Phys. Chem. A* **101** (1997) 7318.
- [21] J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, L. Kuipers, N. F. Van Hulst: „Time varying triplet state lifetimes of single molecules“ *Phys. Rev. Lett.* **83** (1999) 2155.

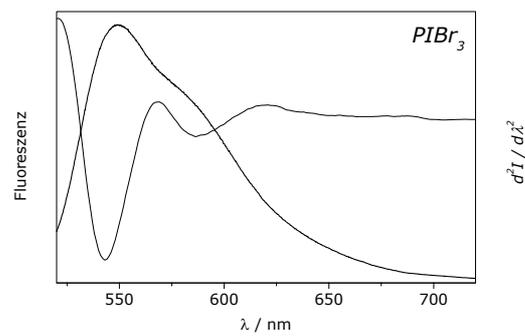
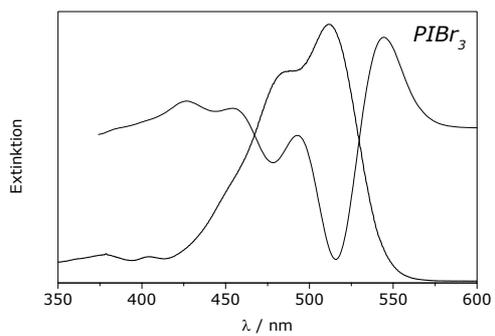
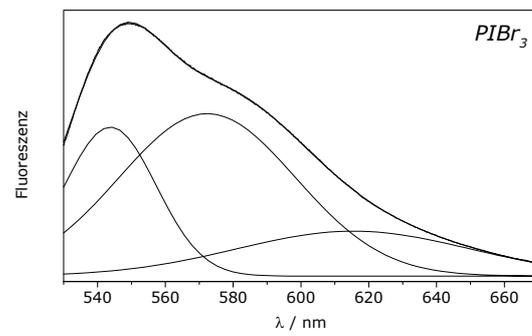
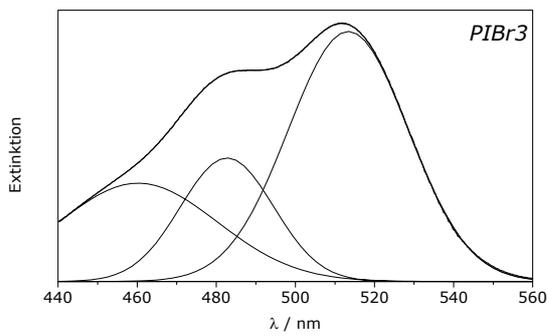
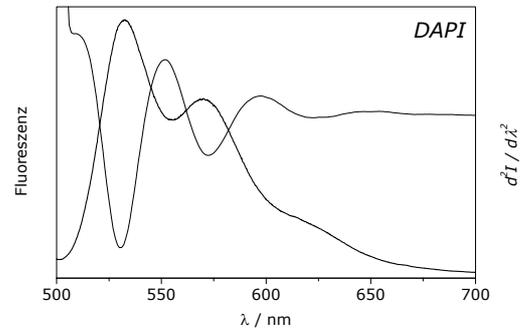
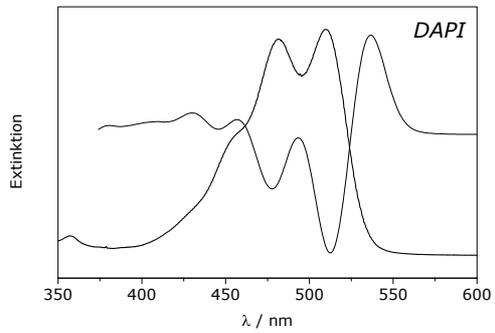
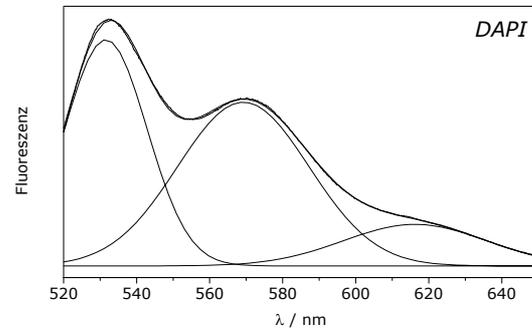
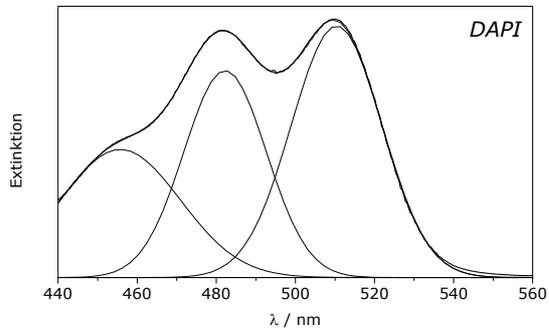
- 
- [22] R. Eisberg, R. Resnick, „Quantum physics of atoms, molecules, solids, nuclei and Particles“, J. Wiley & Sons, New York, 1974.
- [23] A. M. Portis: „Elektonic structures of F centers: Saturation of the elektron spin resonance“ *Phys. Rev.* **91** (1953) 1071.
- [24] A. M. Stoneham: „Shapes of inhomogeneously broadenend resonance lines in solids“ *Rev. Mod. Phys.* **41** (1969) 82.
- [25] S. Kummer, T. Basche, C. Bräuchle: „Terrylene in *p*-terphenyl: A novel single crystalline system for single molecule spectroscopy at low temperatures“ *Chem. Phys. Lett.* **229** (1994) 309.
- [26] S. Becker, A. Böhm, K. Müllen: „New thermotropic dyes based on amino-substituted perylenedicarboximides“ *Chem. Eur. J.* **6** (2000) 3984.
- [27] Acros Feinchemikalien, Produktkatalog 2000.
- [28] Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, VCH, Weinheim, 1983.
- [29] Handbook of Chemistry and Physics, Vol. 59, CRC Press Inc., Boca Raton, 1978.
- [30] Landolt, Börnstein, „Zahlenwerte aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik, Technik“, Vol. 6, Springer Verlag, Berlin, 1951.
- [31] D. W. Van Krevelen: „Properties of Polymers“, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1976.
- [32] Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Vol.16, Wiley & Sons, New York, 1989.
- [33] G. L. Green, T. C. O´Haver: „Derivative luminescence spectroscopy“ *Anal. Chem.* **46** (1974) 2191.
- [34] T. C. O´Haver, G. L. Green: „Numerical error analysis of derivative spectrometry for quantitative analysis of mixtures“ *Anal. Chem.* **48** (1976) 312.

- [35] P. W. Atkins: „Physikalische Chemie“ VCH, Weinheim, 1990.
- [36] F. Stracke, C. Blum, S. Becker, K. Müllen, A. J. Meixner: „Intrinsic conformer jumps observed by single molecule spectroscopy in real time“ *Chem. Phys. Lett.* **325** (2000) 196.
- [37] M. Wrighton, D. L. Morse: „The nature of the lowest excited state in Tricarbonylchloro-1,10-phenantrolinerhenium (I) and related complexes“ *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 998.
- [38] M. K. Wibowo, Schwerpunktarbeit, Universität Siegen (2000).
- [39] X. S. Xie, R. C. Dunn: „Probing single molecule dynamics“ *Science* **265** (1994) 361.
- [40] C. Tietz, R. Daum, A. Dräbenstedt, J. Schuster, L. Fleury, A. Gruber, J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski: „Correlation spectroscopy of individual molecules immobilized on surfaces under ambient conditions“ *Chem. Phys. Lett.* **282** (1998) 164.
- [41] X. S. Xie : „Single molecule spectroscopy and dynamics at room temperature“ *Acc. Chem. Res.* **29** (1996) 598.

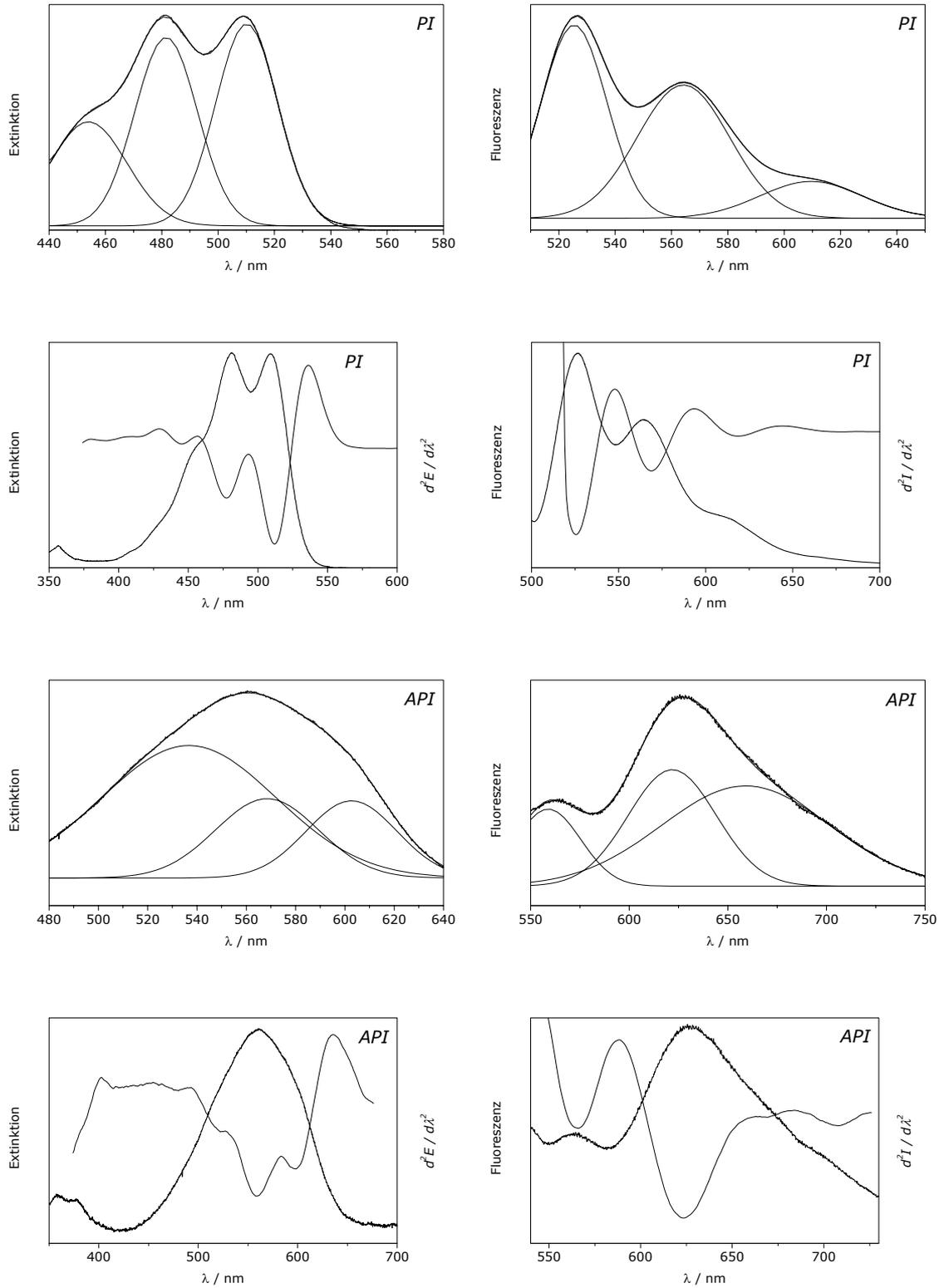
## 7.2 Auswertung der Ensemblespektren

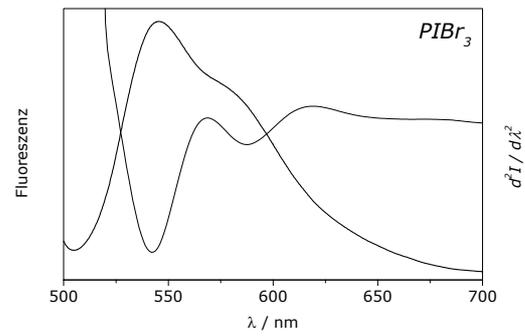
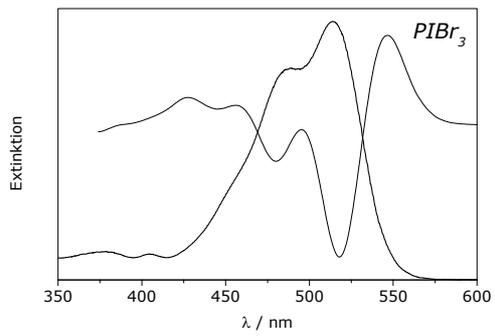
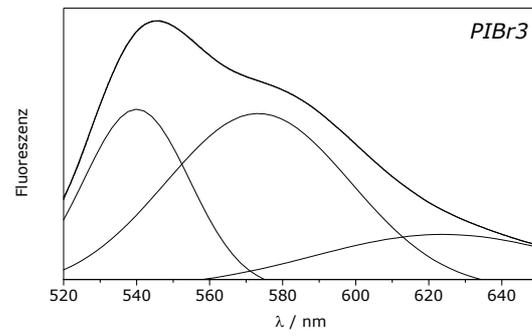
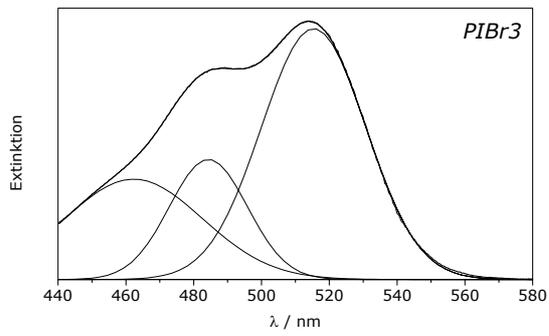
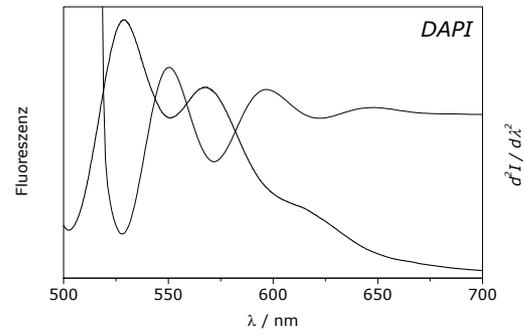
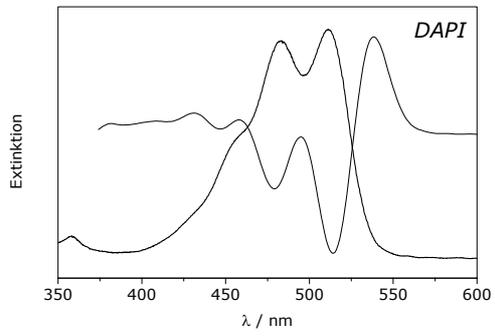
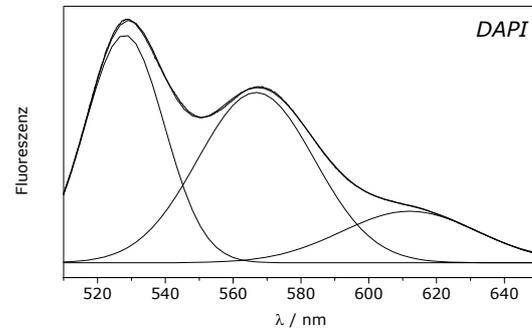
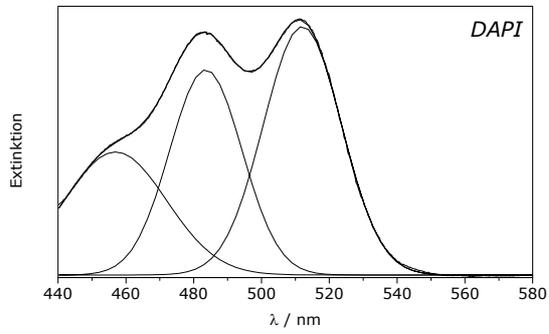
### 7.2.1 Spektren in Toluol





## 7.2.2 Spektren in Polystyrol





### 7.2.3 Gegenüberstellung der Resultate

Die aufgenommenen Ensembleabsorptions- und -fluoreszenzspektren wurden auf verschiedene Weise ausgewertet: (1) durch direktes Ablesen der Koordinaten der spektralen Maxima (D), (2) durch Ermittlung der Wellenlängen der Bandenmaxima im Derivativspektrum zweiter Ordnung ( $E''$ ,  $I''$ ) und (3) durch Anfitten einer vorgegebenen Anzahl von Gaußkurven (GF). Je nach spektraler Form erwiesen sich die verschiedenen Verfahren als unterschiedlich geeignet, die Bandenstruktur der Spektren aufzulösen. Die plausibelsten Werte sind jeweils fett gedruckt. Dabei sind  $\lambda_{i, \max}$  die Wellenlängen der Bandenmaxima (mit hypsochrom laufendem Index  $i$  bei der Absorption, einem bathochrom laufenden bei der Fluoreszenz),  $\sigma_i$  die Bandweiten der Schwingungsbanden (nur bei GF zugänglich), und  $\Phi_{kl}$  die Intensitätsverhältnisse der Banden.

	PI			API			DAPI			PIBr <sub>3</sub>		
	D	GF	I''	D	GF	I''	D	GF	I''	D	GF	I''
$\lambda_{0, \max}$	530,4	<b>530,1</b>	529	528,7	<b>527,8</b>		532,4	<b>531,6</b>	530	549,0	543,8	<b>543</b>
$\lambda_{1, \max}$	568,4	<b>567,9</b>	571	572,0	570,8	<b>569</b>	570,0	<b>569,2</b>	572		572,4	<b>586</b>
$\lambda_{2, \max}$		<b>614,4</b>	621	644,2	641,0	<b>639</b>		<b>616,2</b>	622		615,4	
$\lambda_{3, \max}$					691,3	<b>703</b>						
$\sigma_0$		<b>22</b>			25			<b>22</b>			27	
$\sigma_1$		<b>34</b>			34			<b>36</b>			52	
$\sigma_2$		<b>36</b>			40			<b>39</b>			69	
$\sigma_3$					73							
$\Phi_{1/0}$	0,68	<b>0,70</b>		0,78	<b>0,77</b>		0,69	<b>0,73</b>			1,09	
$\Phi_{2/1}$		<b>0,25</b>						<b>0,25</b>			0,28	
$\Phi_{3/2}$					0,62							

Tabelle 7-1: Fluoreszenzspektren in Toluol. Die Anregungswellenlänge betrug 488nm, im Fall von API 514nm (gilt auch im Folgenden).

	PI			API			DAPI			PIBr <sub>3</sub>		
	D	GF	E''	D	GF	E''	D	GF	E''	D	GF	E''
$\lambda_{0, \max}$	507,1	<b>507,4</b>	510		599,8	<b>593</b>	509,7	<b>510,4</b>	512	511,6	513,4	<b>516</b>
$\lambda_{1, \max}$	479,9	<b>480,2</b>	476	556,0	565,3	<b>555</b>	481,5	<b>482,2</b>	478		482,7	<b>478</b>
$\lambda_{2, \max}$		455,9	445		541,0			<b>455,8</b>	446		460,3	445
$\sigma_0$		25			85			<b>21</b>			30	
$\sigma_1$		19			45			<b>21</b>			24	
$\sigma_2$		34			34			<b>30</b>			40	
$\Phi_{1/0}$	1,01	0,73			1,16		0,96	<b>0,82</b>			0,50	
$\Phi_{2/1}$		0,81			2,70			<b>0,62</b>			0,79	

Tabelle 7-2: Extinktionsspektren in Toluol.

	PI			API			DAPI			PIBr <sub>3</sub>		
	D	GF	I''	D	GF	I''	D	GF	I''	D	GF	I''
$\lambda_{0. \max}$	526,5	<b>525,4</b>	526				528,7	<b>528,0</b>	528	545,0	540,0	<b>542</b>
$\lambda_{1. \max}$	564,0	<b>564,2</b>	569	563,4	558,9	<b>565</b>	567,2	<b>566,8</b>	572		573,3	<b>587</b>
$\lambda_{2. \max}$		<b>609,5</b>	618	626,4	621,8	<b>623</b>		<b>612,1</b>	622		623,4	
$\lambda_{3. \max}$					659,0	<b>708</b>						
$\sigma_0$		<b>23</b>						<b>23</b>			29	
$\sigma_1$		<b>33</b>			33			<b>35</b>			51	
$\sigma_2$		<b>36</b>			45			<b>40</b>			71	
$\sigma_3$					85							
$\Phi_{1/0}$	0,69	<b>0,69</b>					0,73	<b>0,75</b>			0,98	
$\Phi_{2/1}$		<b>0,28</b>						<b>0,30</b>			0,36	
$\Phi_{3/2}$					0,86							

Tabelle 7-3: Fluoreszenzspektren in Polystyrol.

	PI			API			DAPI			PIBr <sub>3</sub>		
	D	GF	E''	D	GF	E''	D	GF	E''	D	GF	E''
$\lambda_{0. \max}$	509,1	<b>510,1</b>	512		602,7	<b>598</b>	511,2	<b>512,1</b>	514	513,9	515,4	<b>518</b>
$\lambda_{1. \max}$	481,2	<b>481,6</b>	477	560,9	568,4	<b>559</b>	483,1	<b>483,6</b>	479	489,2	484,3	<b>480</b>
$\lambda_{2. \max}$		<b>454,0</b>	445		536,7	<b>522</b>		<b>456,9</b>	446		462,3	445
$\sigma_0$		<b>22</b>			37			<b>23</b>			30	
$\sigma_1$		<b>22</b>			42			<b>21</b>			23	
$\sigma_2$		<b>27</b>			71			<b>30</b>			41	
$\Phi_{1/0}$	1,01	<b>0,93</b>			0,97		0,95	<b>0,83</b>		0,82	0,48	
$\Phi_{2/1}$		<b>0,55</b>			1,67			<b>0,59</b>			0,84	

Tabelle 7-4: Extinktionsspektren in Polystyrol.

### 7.3 Temperaturprofil um einen konstant beleuchteten Chromophor

Hier soll die mittlere abstandsabhängige Temperaturerhöhung  $\Delta T(r)$  um ein eingebettetes Farbstoffmolekül abgeschätzt werden, das permanent beleuchtet wird und die absorbierte Leistung  $P_{\text{Abs}}$  durch Fluoreszenz und thermisch an seine Umgebung abgibt. Der Einfachheit halber soll angenommen werden, daß sich das Molekül in der Anregungssättigung befände. Die vom Molekül absorbierte Leistung beträgt dann ( $\nu_{\text{EX}}$ : Anregungswellenzahl,  $\tau_{\text{FL}}$ : Fluoreszenzlebensdauer):

$$P_{\text{Abs}} = \frac{hc\nu_{\text{EX}}}{\tau_{\text{FL}}} \quad (7.1)$$

Der Anteil, der davon thermisch an die Umgebung abgegeben wird, ist ( $\bar{\nu}_{\text{FL}}$ : spektraler Schwerpunkt der Fluoreszenz):

$$P_{\text{th}} = P_{\text{Abs}} \cdot \left( 1 - \phi_{\text{fl}} \cdot \frac{\bar{\nu}_{\text{FL}}}{\nu_{\text{EX}}} \right) \quad (7.2)$$

Bei stationärem thermischen Fluß muß diese Leistung permanent die Sphärenoberflächen  $4\pi r^2$  jeden Abstands  $r$  vom Chromophor durchfließen. Der Wärmefluß wird durch die Fouriersche Gleichung beschrieben ( $\Lambda$ : Wärmeleitfähigkeit):

$$P_{\text{th}} = -\Lambda \cdot 4\pi r^2 \cdot \frac{\partial T}{\partial r} \quad (7.3)$$

Umstellung und Integration zwischen den angepaßten Grenzen liefert ( $T^0$ : Umgebungstemperatur):

$$\int_{T^0}^{T(r)} dT = - \int_{\infty}^r \frac{P_{\text{th}}}{4\pi r^2 \cdot \Lambda} dr \quad (7.4)$$

$$\Delta T(r) = T(r) - T^\theta = \frac{P_{th}}{4\pi\Lambda r} \quad (7.5)$$

Das ist bereits die Endgleichung. Ausgeschrieben lautet sie:

$$\Delta T(r) = \frac{1}{4\pi\Lambda r} \cdot \frac{hc\nu_{EX}}{\tau_{FL}} \cdot \left(1 - \phi_{fl} \cdot \frac{\bar{\nu}_{FL}}{\nu_{EX}}\right) \quad (7.6)$$

Für  $r \rightarrow \infty$  folgt wie erwartet  $\Delta T \rightarrow 0$ ,  $r \rightarrow 0$  führt jedoch zu  $\Delta T \rightarrow \infty$ . Da Radien unterhalb des halben Farbstoffmoleküldurchmessers ohnehin physikalisch sinnlos sind, da die Photonenenergie nicht von einem ausdehnungslosen Punkt absorbiert wird, entsteht kein grundsätzliches Problem.

Nun soll diese Beziehung auf ein typisches PI-Molekül in Polystyrol angewandt werden. Die Fluoreszenzeffizienz von PI beträgt  $\phi_{FL} \approx 0,7$ . Die Fluoreszenzlebensdauer soll mit 4ns angenommen werden. Der spektrale Schwerpunkt der Fluoreszenz in der Dimension der Wellenzahl wird hier einfach als Kehrwert des spektralen Schwerpunkts in der Dimension der Wellenlänge angenähert. Die Wärmeleitfähigkeit von Polystyrol wurde bereits in Kapitel 3 mit  $\Lambda = 0,16\text{W/Km}$  angegeben. Es ergibt sich eine absorbierte Leistung von  $1,018 \times 10^{-10}\text{W}$ , der thermische Anteil beträgt  $0,3911 \times P_{Abs} = 3,98 \times 10^{-11}\text{W}$ . Für das betrachtete System findet man  $\Delta T(r) = (1,98 \times 10^{-11}\text{Km})/r$ . Einige Werte sind in Tabelle 7-5 angegeben. Es zeigt sich, daß die Temperaturerhöhung in der molekularen Umgebung vernachlässigbar gering ist. Das ist nicht überraschend, vergleicht man die Fluoreszenzlebensdauer (einige ns) mit den Zeitkonstanten vibratorischer Relaxationen (einige ps). Die Temperaturerhöhungen  $\Delta T(r)$  unterhalb der Anregungssättigung lassen sich durch eine geeignete Korrektur der absorbierten Leistung bestimmen und fallen noch geringer aus.

r / nm	1	2	3	4
$\Delta T / \text{K}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$6,6 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$

Tabelle 7-5: Einige Werte für PI in Polystyrol für Abstände in der Dimension von Farbstoffmoleküldurchmessern (Für PI beträgt dieser in der Längsachse  $\sim 1,5\text{nm}$ ).