

Einzelmolekülspektroskopie

Johanna Lix Jonas Elschner

Juni 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
2	Theoretischer Hintergrund	2
2.1	Atome und Moleküle	2
2.2	Das Franck-Condon Prinzip	3
2.3	Fluoreszenz einzelner Moleküle und Ensembles	3
2.4	Numerische Apertur und Auflösungsvermögen	5
2.5	Konfokale Mikroskopie	6
2.6	Binning der CCD-Kamera	7
3	Materialien und Methoden	8
3.1	Versuchsaufbau	8
3.2	Präparation der Probe	9
4	Durchführung und Auswertung	9
4.1	Untersuchung der Untergrund-Messungen und Nachbearbeitung der Aufnahmen	9
4.2	Kalibration des Spektrographen	11
4.3	Auswertung des Weitfeld-Bildes	13
4.3.1	Blinking und Photobleichen	13
4.3.2	Polarisation der Fluoreszenz	15
4.4	Auswertung von Spektren	20
4.5	Einzelmolekülspektren von Perylenbisimid (PBI)	20
5	Fazit	24
6	Literatur	25

1 Einleitung

Im Bereich der weichen Materie gibt es viele Systeme, die wesentlich komplexere Eigenschaften haben als „einfache“ Feststoffe oder Fluide. Um denselben Grad an Übereinstimmung zwischen Modell und Beobachtung zu erreichen, sind beispielsweise für die Modellierung des Verhaltens einer lebenden Zelle wesentlich mehr Parameter notwendig als bei einem Tropfen Wasser. Dies hat insbesondere zwei Gründe: Zum einen ist eine lebende Zelle ein System im thermodynamischen Nichtgleichgewicht, weshalb hier zeitabhängige Prozesse einen wesentlichen Beitrag zum Verhalten liefern und die Eigenschaften räumlich variieren. Zum anderen besitzt eine Zelle auf mikroskopischer Skala mehr Freiheitsgrade als ein Wassertropfen, da die darin vorhandenen Makromoleküle (z. B. Proteine) mehr Freiheitsgrade haben als kleinere Moleküle (z. B. Wassermoleküle). Um eine Einsicht in die Funktionsweise eines solchen komplexen Systems zu erhalten, müssen daher erstens zeitabhängige Prozesse auf einer mikroskopischen Skala untersucht werden; zweitens müssen dafür einzelne Bereiche der Zelle lokal betrachtet werden.

Für ersteres bietet sich die Methode Spektroskopie an, für zweiteres die Mikroskopie. Eine Kombination aus beiden Methoden bietet die Einzelmolekül-Spektroskopie, die in diesem Praktikumsversuch angewandt wird. Um die Methode auszuprobieren, werden wir die Fluoreszenz einzelner Moleküle der Substanz Perylenbisimid (PBI) sowohl zeit- als auch frequenz aufgelöst untersuchen. Im Folgenden wird zunächst der theoretischen Hintergrund des Versuchs dargestellt.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Atome und Moleküle

Fluoreszenz ist ein physikalisches Phänomen, bei dem ein Material Licht absorbiert und anschließend in einem zeitlich verzögerten Prozess wieder abstrahlt.

Dabei wird die absorbierte Energie in Form von emittiertem Licht niedrigerer Energie (längerer Wellenlänge) freigesetzt. Man kann diesen Effekt z. B. bei Atomen und Molekülen beobachten. Allerdings unterscheiden sich das Fluoreszenzemissionsspektrum eines Atoms von dem eines Moleküls in einigen Punkten. Das Fluoreszenzemissionsspektrum eines Atoms entsteht, wenn ein Atom durch eine externe Energiequelle, wie zum Beispiel Licht, angeregt wird. Dabei absorbieren die Elektronen des Atoms Energie und gelangen in höhere Energieniveaus. Anschließend fallen die Elektronen in niedrigere Energieniveaus zurück und geben dabei die überschüssige Energie in Form von Licht wieder ab. Da die energetischen Übergänge der Elektronen nur zwischen diskreten Energieniveaus stattfinden, besteht das Fluoreszenzemissionsspektrum aus scharfen Linien.

Im Gegensatz dazu besteht das Fluoreszenzemissionsspektrum eines Moleküls aus breiten Banden oder Kurven, da die einzelnen Atome sowie Kerne im Molekül nun mehr Freiheitsgrade besitzen. Neben den diskreten energetischen

Übergängen kommen somit zusätzlich Schwingungs- und Rotationsübergängen hinzu. Das Fluoreszenzemissionsspektrum eines Moleküls ist also kontinuierlich.

2.2 Das Franck-Condon Prinzip

Laut dem Franck-Condon-Prinzip erfolgt ein elektronischer Übergang so schnell, dass die Kerne ihre Position beim Übergang beibehalten. Die Anregung wird in Abb. 1 durch den blauen Pfeil (Abbildung links) dargestellt. Nach der elektronischen Anregung befinden sich die Kerne nicht mehr in ihrem Gleichgewichtszustand. Das Anregungsspektrum (blaues Spektrum Abb. 1 rechts) kommt durch die verschiedenen möglichen elektronischen Anregungen von $\nu'' = 0$ zustande (blauer Pfeil Abb. 1 links). In dem neuen Potential findet nun ein strahlungsloser Übergang auf $\nu' = 0$ statt. Von dort erfolgt ein vibronischer Übergang der Kerne, beispielsweise von $\nu' = 2$ zu $\nu' = 0$. Der grüne Pfeil in Abb. 1 veranschaulicht den Übergang der Kerne in den neuen Kern-Kern Abstand. Hierbei ist entscheidend, wie gut die Überlappung der Kernwellenfunktionen vor sowie nach der Anregung ist. Das Molekül emittiert bei dem energetischen Übergang in den neuen Grundzustand (grüner Pfeil) ein Photon. Es können verschiedene Übergänge von $\nu' = 0$ zu ν'' stattfinden. Jeder Übergang repräsentiert hierbei eine Linie im Fluoreszenzspektrum (Abb. 1 rechte Seite). Da in diesem Beispiel der Übergang von $\nu' = 0$ auf $\nu'' = 2$ am Wahrscheinlichsten ist, ist die Intensität dieses Peaks im Spektrum am höchsten.

Das Franck-Condon Prinzip basiert auf der Born-Oppenheimer-Näherung welche besagt, dass aufgrund des zeitlichen Unterschiedes bei einem energetischen Übergang eines Moleküls die Änderung der Kern- sowie der Elektronenwellenfunktion getrennt voneinander betrachtet werden können. Somit erlaubt die Born-Oppenheimer-Näherung eine Separation der Gesamtwellenfunktion eines Systems gemäß

$$\Psi(r, R) \approx \Psi_{\text{Elektronen}}(r) \cdot \Psi_{\text{Kerne}}(R) \quad (1)$$

Bei der Betrachtung eines elektronischen Übergangs

$$\langle \Psi_f(R), \Psi_f(r) | \mu | \Psi_i(R), \Psi_i(r) \rangle \approx \langle \Psi_f(R) | \Psi_i(R) \rangle \langle \Psi_f(r) | \mu | \Psi_i(r) \rangle \quad (2)$$

bezeichnet $\Psi_i(r)$ und $\Psi_i(R)$ die Elektronen- sowie die Kernwellenfunktion vor dem elektronischen Übergang, $\Psi_f(r)$ sowie $\Psi_i(R)$ die Elektronen- sowie die Kernwellenfunktion nach dem Übergang. μ ist das Übergangsdipolmoment. Der Term $\langle \Psi_f(R) | \Psi_i(R) \rangle$ wird als Franck-Condon-Faktor bezeichnet. Er ist proportional zur Übergangsrate und ist somit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit von Übergängen zwischen verschiedenen Schwingungszuständen eines Moleküls.

2.3 Fluoreszenz einzelner Moleküle und Ensembles

Wird ein polarisierbares Molekül als harmonischer Oszillator mit (Kreis-)Frequenz ω_0 betrachtet, kann sein Verhalten durch die Bewegungsgleichung

$$\left(\frac{d^2}{dt^2} + \gamma \frac{d}{dt} + \omega_0^2 \right) x(t) = f(t) \quad (3)$$

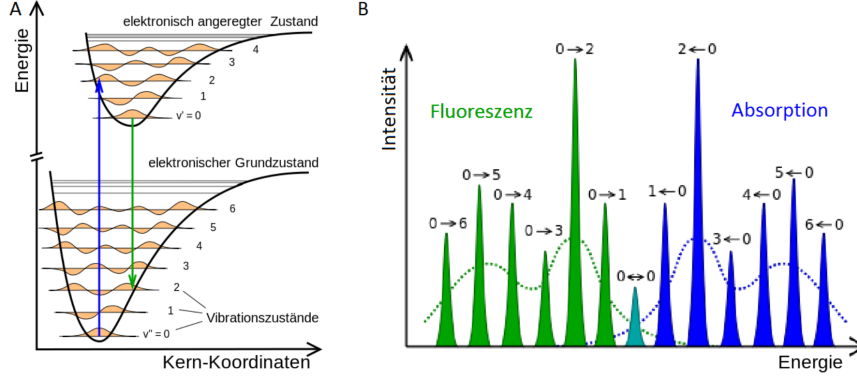


Abbildung 1: Abbildung (links) des energetischen Kernpotentials gegenüber des Kernabstandes; die senkrechten Pfeile stellen Vibrationsübergänge bei energetischer Anregung (blau) sowie der Emission (grün) dar; Zusätzlich Abbildung (rechts) eines Anregungsspektrums (blau) sowie eines Fluoreszenzspektrums (grün) (Abbildung aus [8]).

eines gedämpften harmonischen Oszillators beschrieben werden.[6, S. 740] Die Fourier-Transformation von Gleichung (3) liefert

$$(-\omega^2 + -i\gamma\omega_0 + \omega_0^2) x(\omega) = f(\omega), \quad (4)$$

was sich umstellen lässt zu

$$x(\omega) = \frac{f(\omega)}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\gamma\omega_0} = \frac{(\omega_0^2 - \omega^2) + i\gamma\omega_0}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 - \gamma^2\omega_0^2} f(\omega). \quad (5)$$

Für eine instantante Anregung $f(t) = \delta(t)$ gilt $f(\omega) = 1$ und Gleichung (5) beschreibt die Emission einer elektromagnetischen Welle, deren Linienprofil (eine sogenannte *Lorentz-Kurve*) neben der Eigenfrequenz ω_0 nur von der Dämpfungskonstante γ und damit von der Lebensdauer des Schwingungszustandes des Moleküls abhängt.[6, S. 741] Die resultierende spektrale Breite heißt *natürliche Linienbreite* und ist eine Eigenschaft des einzelnen Moleküls.

Wird nun derselbe Versuch mit einem Ensemble an wechselwirkenden Molekülen durchgeführt, so unterscheiden sich deren Eigenfrequenzen ω_0 aus verschiedenen Gründen, insbesondere

- Verschiebung der molekularen Energie-Niveaus infolge elektrostatischer Wechselwirkungen der Moleküle untereinander. Diese Energie-Differenz ist die Summe der Beiträge der Wechselwirkung mit jedem anderen Molekül des Ensembles. Letztere hängen wiederum von den Abständen der jeweiligen anderen Moleküle ab. Sofern diese als unabhängige Zufallsvariablen betrachtet werden können, sind die resultierenden Verschiebungen

der molekularen Energieniveaus nach dem zentralen Grenzwertsatz Gauß-verteilt[1, S. 36] und es ergibt sich ein Gauß-förmiges Linienprofil.

- Verschiebung der molekularen Energie-Niveaus durch Stöße der Moleküle untereinander.
- Rot- oder Blauverschiebung der emittierten Strahlung durch den optischen Doppler-Effekt bei Molekülen in der Gasphase.

Alle diese Effekte führen zu einer Linienverbreiterung; insbesondere wird die Linienform nun nicht mehr von den Eigenschaften eines einzelnen Moleküls (Lorentz-Kurve), sondern von den statistischen Eigenschaften des Ensembles (Gauß-Kurve) bestimmt.

Der Vorteil der Einzelmolekül-Spektroskopie besteht nun darin, dass aus der Linienform Eigenschaften eines einzelnen Moleküls bestimmt werden können, die aus dem Spektrum eines Ensembles nicht herausgelesen werden können. Nachteile sind, dass die Aufnahme eines Einzelmolekül-Spektrums technisch aufwändig ist, insbesondere da Wechselwirkungen des Moleküls mit anderen verhindert werden müssen und die Intensität der von einem einzelnen Molekül emittierten Strahlung um ein Vielfaches geringer ist als die eines Ensembles. Aus letzterem Grund ist die Einzelmolekülspektroskopie weniger aufwändig Molekülen mit höherer *Quantenausbeute*, wie das Verhältnis der Anzahl emittierter zur Anzahl absorbierter Photonen bei der Fluoreszenz bezeichnet wird.[4, S. 301]

2.4 Numerische Apertur und Auflösungsvermögen

Das Auflösungsvermögen eines optischen Aufbaus kann mit Abbés Theorie der Bildentstehung erklärt werden. Wir betrachten den Fall, dass ein Gegenstand mit einer Linse endlichen Durchmessers auf einen Schirm abgebildet wird. Eine Linse endlichen Durchmessers kann in der Theorie durch die Positionierung einer kreisförmigen Blende endlichen Durchmessers unmittelbar vor einer Linse unendlichen Durchmessers beschrieben werden.

Da dann ein Teil der Lichts auf die Blende und nicht auf die Linse trifft, gelangt nicht das gesamte vom Gegenstand ausgehende Licht zum Schirm. Wie eine genauere Betrachtung zeigt, ergibt sich daraus das Bild des Gegenstandes als Faltung des sich ohne Blende ergebenden Bildes mit dem Beugungsbild der Blende. Dieses besteht aus einem zentralen Maximum der Intensität, umgeben von konzentrischen Ringen.

Werden folglich zwei Punkte im Abstand d als Gegenstand gewählt, ist das Bild jedes einzelnen das Beugungsbild der Blende; dieses wird daher auch *Point spread function* genannt.[7] Nach dem Rayleigh-Kriterium lassen sich die Bilder der Punkte genau dann unterscheiden, wenn ihr Abstand auf dem Schirm mindestens so groß ist wie der Abstand des zentralen Maximums vom ersten Minimum des Beugungsbildes der Blende. Eine weitere Rechnung zeigt, dass dies erfüllt ist genau für

$$d \geq 1,22 \frac{\lambda f'}{nR} =: 1,22 \frac{\lambda}{nNA}, \quad (6)$$

wobei R der Radius der Linse, f' ihre hintere Brennweite, n der Brechungsindex des die Linse umgebenden Mediums und λ die Vakuum-Wellenlänge des verwendeten Lichts ist. Die Größe $NA := \frac{R}{f'}$ wird als *numerische Apertur* bezeichnet.[6, S. 542]

Beim vorliegenden Aufbau wird das von einem einzelnen Molekül emittierte Licht mittels eines Mikroskops betrachtet. Damit die Bilder der einzelnen Moleküle aufgelöst werden können, muss ihr Abstand dafür größer sein als der Abstand d aus Gleichung (6). Dies wird erreicht durch eine hinreichend geringe Konzentration der zu untersuchenden Moleküle in der Probe sowie durch Verwendung von Immersions-Öl mit einem Brechungsindex $n > 1$.

2.5 Konfokale Mikroskopie

Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau eines Konfokalmikroskops. Dieser beinhaltet zwei optische Bauteile wie Linsen oder Objektiv, einer Lochblende (Pinhole) und einem Strahlteiler. Die Lichtquelle, z.B. ein Laser (rote Linie), wird zunächst vom Strahlteiler durch das Objektiv in die Probe geleitet. Von dort aus gelangt das Signal von der Probe (grüne Linie) durch das selbe Objektiv zurück zum Strahlteiler, welcher für das Probensignal transmittiv wirkend gewählt wurde und den Strahl bis hin zur Linse passieren lässt. Das von der Linse gebrochene Licht gelangt durch die Lochblende zum Detektor. Die Lochblende wird im Fokus der Linse platziert. Dadurch passieren die Strahlen aus der Fokalebene vollständig das Pinhole, während das Signal ober- sowie unterhalb der Fokalebene zu einem großen Teil vom Pinhole blockiert wird. Das Pinhole stellt also sicher, dass lediglich das Probensignal detektiert werden kann.

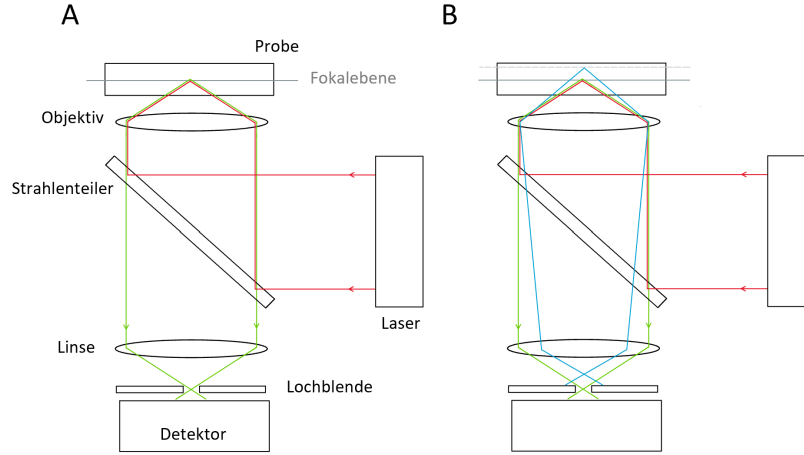


Abbildung 2: Abbildung 3: (A) Schematische Darstellung eines konfokalen Linsensystems; (B) Linsensystem mit zusätzlichem Strahl (blau), welcher sich nicht in der Fokalebene entsteht

2.6 Binning der CCD-Kamera

Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern werden die Datenpunkte der CCD-Kamera mit 2×2 gebinnt. Hierbei kann die Einhüllende des Signals der CCD Kamera mit einer beliebigen Funktion $f_{(t)}$ dargestellt werden. Durch das Binning wird $f_{(t)}$ mit einer Rechtecksfunktion $rect_{(t)}$ gefaltet. Die Darstellung einer Faltung im Realraum entspricht einer Multiplikation im Fourieraum. Wir können also den Term

$$f_{(x)} \rightarrow f_{(\omega)} \cdot \frac{\sin(\omega)}{\omega} \quad (7)$$

betrachten. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist gegeben durch

$$SNR = \frac{f_{(\omega_S)}}{f_{(\omega_R)}} \underset{\text{Gl. 7}}{\approx} \frac{f_{(\omega_S)}}{f_{(\omega_R)}} \cdot \frac{\omega_S}{\omega_R} \quad (8)$$

wobei gilt, dass $\omega_S < \omega_R$. Der Term $\frac{\omega_S}{\omega_R}$ ist kleiner als 1, somit verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis bei der Verwendung eines Binnings.

Die CCD-Kamera wird mit einem 2×2 -Binning betrieben. Welchen Vorteil bietet das Binning für das Experiment

3 Materialien und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Als Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenz wird im Versuch ein Laser der Wellenlänge 512 nm verwendet; er ist in einem Kasten verbaut, dessen Öffnung sich mit einer Klappe (dem sogenannten *Shutter*) öffnen und schließen lässt. Durch Verstellen des Graufilter-Rads im Strahlengang kann die Intensität des Lichts im folgenden Teil des Strahlengangs variiert werden, bevor es unter Verwendung verschiedener Spiegel und Filter auf die Probe fällt.

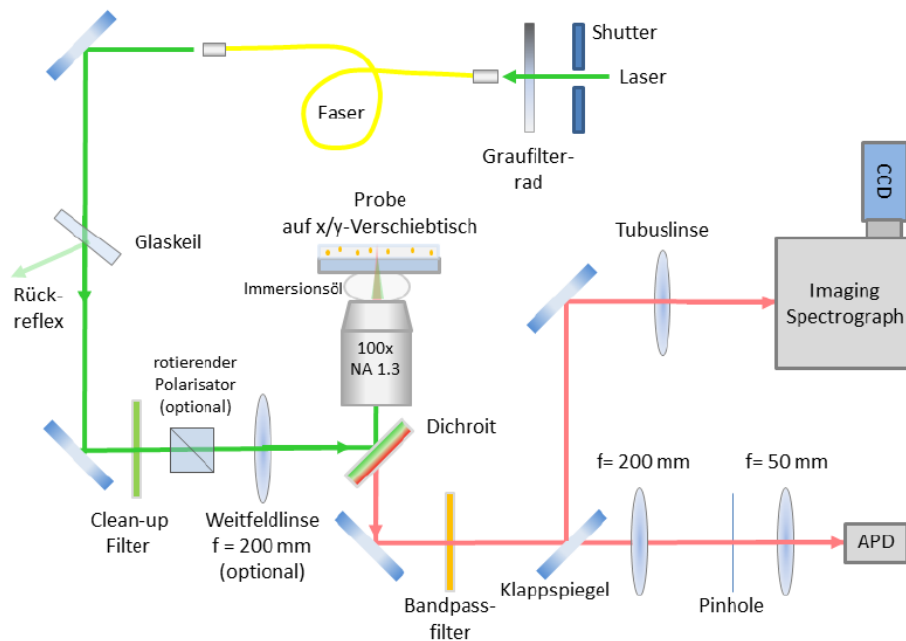


Abbildung 3: Versuchsaufbau (aus [3, S. 2]). Da im vorliegenden Versuch keine konfokale Spektroskopie betrieben wurde, wurden das Pinhole und der Photodetektor (APD) nicht verwendet; eine Beschreibung der Funktion der restlichen Bauteile ist im Fließtext zu finden.

Diese befindet sich auf einem x - y -Verschiebetisch, der auf dem Objektiv eines Mikroskops aufgebracht ist. Befindet sich keine weitere Linse im Strahlengang, wird der Laser nur auf einen vergleichsweise kleinen Bereich der Probe fokussiert, wohingegen nach dem Einbau der abgebildeten Weitfeld-Linse die Probe großflächig beleuchtet wird. Außerdem kann optional ein elektrisch angetriebener rotierender Polarisator in den Strahlengang eingebaut werden.

Das infolge der Anregung von der Probe emittierte Licht passiert anschließend erneut das Objektiv und wird, wieder unter Verwendung verschiedener

Spiegel und Filter, in den Gitterturm gelenkt (in Abbildung 3 als *Imaging Spectrograph* bezeichnet). Dort trifft das Licht je nach Einstellung entweder auf einen Spiegel oder auf ein Gitter und wird in beiden Fällen anschließend auf eine CCD-Kamera gelenkt. Der Spiegel wird genau dann verwendet, wenn die Weitfeldlinse im Strahlengang eingebaut ist; dann wird ein Bild der fluoreszierenden Probe auf die Kamera abgebildet (ein sogenanntes *Fluoreszenzbild*). Im Fall ohne Weitfeldlinse wird der Gitterturm so eingestellt, dass das Licht auf das Gitter trifft; dann wird das von den Molekülen emittierte Licht am Gitter gebeugt und ein Bild des Spektrums auf die Kamera abgebildet.

3.2 Präparation der Probe

Beim vorliegenden Versuch wurden Perylenbisimid-Moleküle (kurz PBI) in einer Polystyrol-Matrix (kurz PS) untersucht. Hierfür wurden zunächst 10 μL einer Lösung von PBI in Wasser ($c = 0,1 \text{ nmol L}^{-1}$) zusammen mit 50 μL einer Lösung von PS in Toluol ($c = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) in eine Glasflasche pipettiert und vermischt. Mit einem *Spincoater* wurde anschließend ein Glasplättchen mit 25 μL der so hergestellten Lösung beschichtet; die Drehfrequenz betrug 1000 min^{-1} . Um organische Moleküle von den Oberflächen der Glasflasche und des Glasplättchens zu entfernen, wurden beide vor Verwendung in der Flamme eines Gasbrenners erhitzt. Anschließend konnte die Probe in den Versuchsaufbau eingebaut werden.

4 Durchführung und Auswertung

4.1 Untersuchung der Untergrund-Messungen und Nachbearbeitung der Aufnahmen

Die Bilder wurden vor der Auswertung mit dem Programm *Fiji* bearbeitet. Um die hierfür notwendigen Schritte zu ermitteln, wurde zunächst die Untergrund-Messung betrachtet.

Vor oder nach den Aufnahmen der fluoreszierenden Moleküle wurde vom Untergrund jeweils eine Sequenz von Bildern aufgenommen. Da die Untergrund-Messung damit zwar zeitaufgelöst war, aber nicht zeitgleich mit den anderen Messungen stattfand, erscheint hier nur eine Betrachtung ihres zeitlichen Mittels sinnvoll. Hierfür wurden im Programm *Fiji* die Intensitäten jedes einzelnen Pixels über alle Aufnahmen einer Sequenz mit der Funktion `Image > Stacks > Z Project` gemittelt, d. h. für die Option `Start slice` wurde der Wert 1 und für `Stop slice` die Anzahl der Aufnahmen in einer Sequenz eingegeben. Als `Projection type` wurde `Average Intensity` gewählt.

Mittels `Image > Adjust > Brightness/Contrast...` wurde das resultierende Bild anschließend so bearbeitet, dass die zu untersuchenden Aspekte hinreichend gut sichtbar waren. Wie sich durch Ausprobieren gezeigt hat, dass dies durch Variation der Parameter `Minimum displayed value` und `Maximum displayed value` (einstellbar nach Klicken auf den Button `Set`) erreichbar. Im

Fälle der Untergrund-Messung haben sich für diese beiden Parameter die Werte 800 und 1000 als geeignet herausgestellt; das Ergebnis ist in Abbildung 4 zu sehen.



Abbildung 4: Untergrund-Messung mit geschlossenem Shutter und Spiegel im Strahlengang des Gitterturms. Das Bild zeigt das Mittel einer Sequenz aus 100 Bildern; für `Minimum displayed value` und `Maximum displayed value` wurden die Parameter 800 und 1000 gewählt. Bei den Pixeln, die deutlich heller sind als ihre Umgebung, handelt es sich vermutlich um sogenannte *Hot-Pixels* der CCD-Kamera, die auch ohne Anregung durch Licht ein elektrisches Signal zurückgeben.

Die Untergrund-Messung zeigt Pixel, die wesentlich heller sind als ihre Umgebung. Da diese im zeitlichen Mittel vorliegen, erscheinen thermische Fluktuationen als Ursache unwahrscheinlich. Stattdessen handelt es sich vermutlich um sogenannte *Hot-Pixels*, also bestimmte Pixel der CCD-Kamera, die auch ohne Anregung durch Licht ein elektrisches Signal zurückgeben.[5] U. a. um ihren Einfluss zu eliminieren, wurde daher die Untergrund-Messung von den Aufnahmen der fluoreszierenden Moleküle subtrahiert (*ohne* zuvor die Parameter in `Brightness/Contrast...` zu ändern). Hierfür wurde die Funktion `Process > Image Calculator...` mit der Option `Subtract` verwendet; als `Image2` wurde die gemittelte Untergrund-Messung gewählt und als `Image1` diejenige Aufnahme, von der der Untergrund abgezogen werden soll. Beim resul-

tierende Bild wurden anschließend wieder die Parameter `Minimum displayed value` und `Maximum displayed value` eingestellt.

4.2 Kalibration des Spektrographen

Für die Wellenlängenkalibration des Spektrographen wurde das Licht der Deckenlampe bei geschlossenem Shutter vermessen und anschließend mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Um ein möglichst geringes Signal-Rausch Verhältnis zu erzielen wurde von den gemittelten Bildsequenzen des Deckenlichtspektrums das gemittelte Hintergrundspektrum abgezogen. Für das Mitteln der Bilder wurde in ImageJ die Funktion `Z Project` bei einer `Average Intensity` verwendet, wobei anschließend mit der Funktion `Image Calculator` die Hintergrundmessung von dem Hg-Leuchtröhrenspektrum abgezogen wurde. Abb. 5 zeigt das Spektrum des Hg-Leuchtmittels der Deckenleuchte mit korrigiertem Untergrund. Das Intensitätsprofil kann mit dem `Rectangle-Werkzeug` und der Funktion `Plot Profile` im Register `Analyze` erstellt werden, jedoch zeigt dies nur die Intensitätswerte zu jedem Pixel in horizontaler Richtung. Um für die weitere Auswertung eine Umrechnung in Wellenlängen zu erzielen, wird daher eine Geradengleichung mithilfe von bereits bekannten charakteristischen Peaks der Hg-Leuchtröhren erstellt und somit die Wellenlänge für jedes Pixel bestimmt. Die vom Detektor registrierten Daten wurden mithilfe eines Python Programms geplottet, siehe Abb. 6. Weiter wurden die Positionen der Pixel einiger bekannter Peaks der Hg-Leuchtröhren bestimmt und in einem weiteren Diagramm gegenüber der jeweiligen bekannten Wellenlängen dargestellt. Durch die Messpunkte wurde mithilfe von Python eine Regressionsgerade durch die Messpunkte gelegt. Mithilfe der Fitparameter lässt sich somit die Geradengleichung

$$\lambda = 0,51 \cdot x + 422,71 \quad (9)$$

aufstellen. Somit kann in allen weiteren Abbildungen die x-Achse von Pixel auf Wellenlänge kalibriert werden.

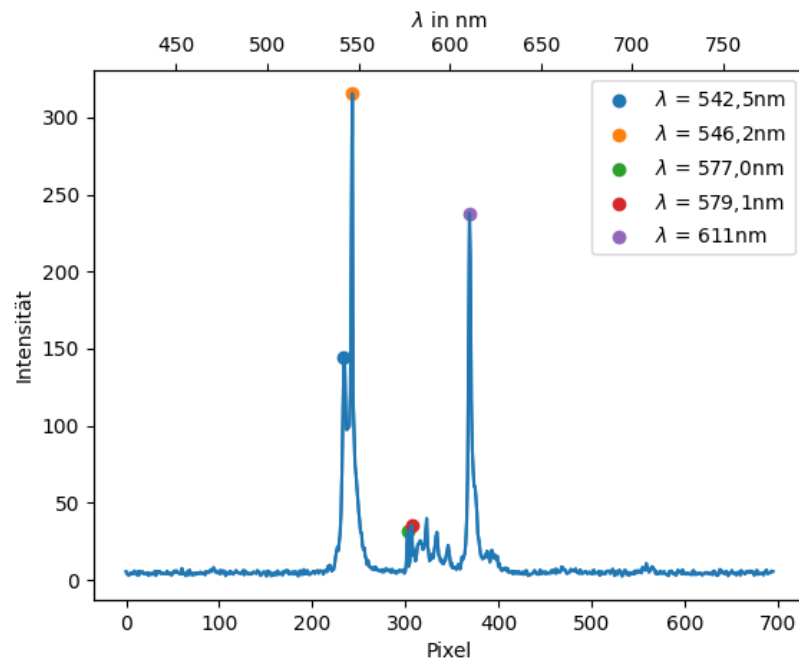


Abbildung 5: Spektrum der Deckenlampen in Abhängigkeit der Pixel gegenüber der Intensität; farbig markierte charakteristische Peaks der Hg-Leuchtröhren mit zugehöriger bekannter Wellenlänge; obige x-Achse stellt die bereits umgerechnete Skala von Pixel in Wellenlängen dar gemäß der Kalibrationsgeraden aus Gl. 9

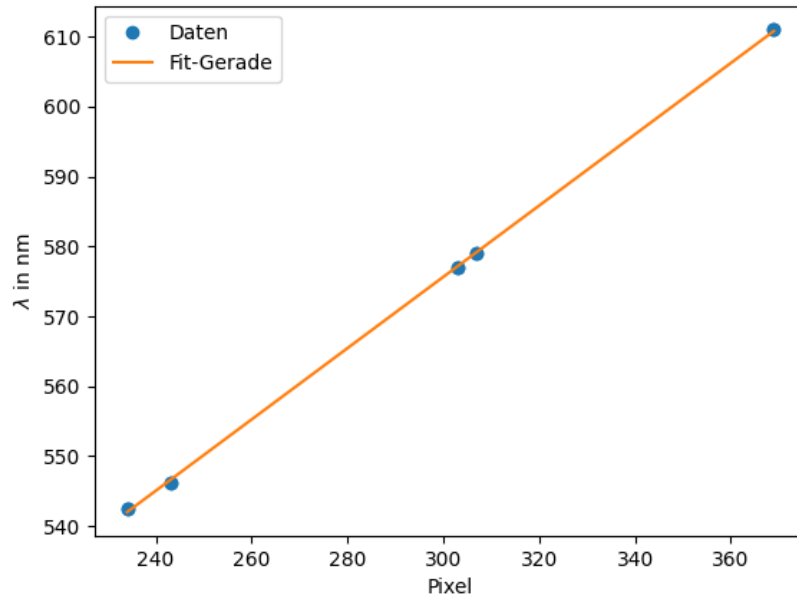


Abbildung 6: Datenpunkte der bekannten charakteristischen Peaks der Hg-Leuchtröhren gegenüber bekannten Wellenlängen des Deckenlampenspektrums (blau); Regressionsgerade der Datenpunkte (orange)

4.3 Auswertung des Weitfeld-Bildes

4.3.1 Blinking und Photobleichen

Für diesen Versuchsteil wurde am Laser eine Anregungs-Leistung von 0,8 mW gewählt; der Gitterturm wurde so eingestellt, dass sich nicht das Beugungsgitter, sondern der Spiegel im Strahlengang befindet (Einstellung **Grating: Tur: 1 2, 1200 g/nm, Blz=Mirror**). Auf diese Weise wird ein Fluoreszenz-Bild der Probe auf die CCD-Kamera abgebildet. Sowohl von diesem (mit geöffnetem Shutter) als auch vom Untergrund (mit geschlossenem Shutter) wurde anschließend eine Sequenz von 100 Aufnahmen erstellt. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurde zunächst der Untergrund vom Fluoreszenz-Bild subtrahiert und dieses anschließend durch Anpassen des **Minimum displayed value** und **Maximum displayed value** bearbeitet; für diese Parameter wurden hier die Werte 0 und 250 gewählt. Das so bearbeitete erste Bild der Sequenz ist in Abbildung 7 zu sehen.

Wie in der gesamten Sequenz sind in der Abbildung 7 vereinzelt Punkte erkennbar, die deutlich heller sind als ihre Umgebung. Der Vergleich mit ähnlichen Aufnahmen aus der Literatur [2, S. 3] lässt uns darauf schließen, dass es sich bei diesen Punkten um einzelne fluoreszierende PBI-Moleküle handelt.

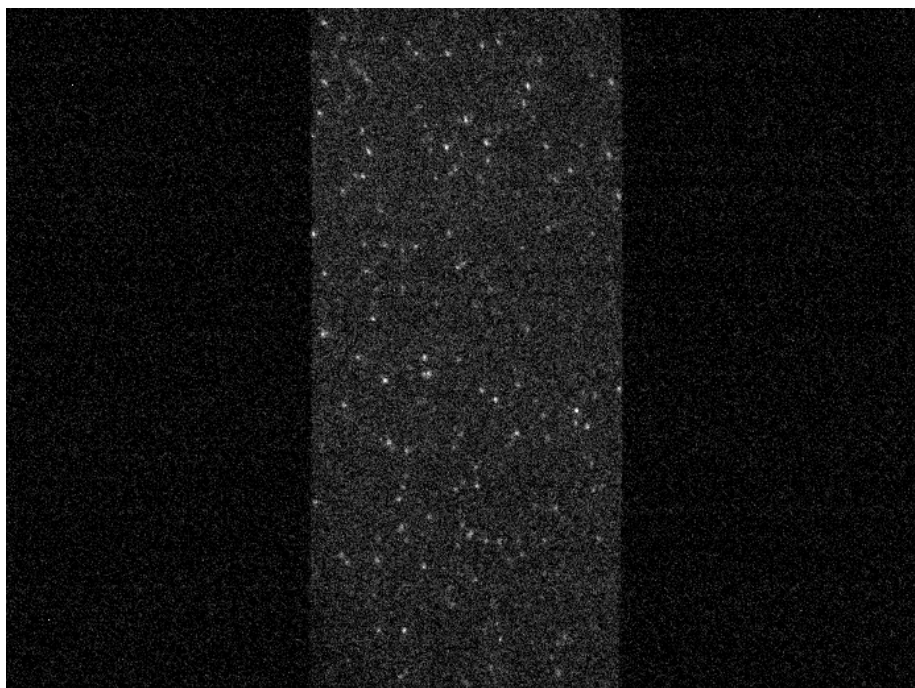


Abbildung 7: Fluoreszenz-Bild der verwendeten Probe von PBI-Molekülen ($c = 0,12 \text{ nmol L}^{-1}$). Die Abbildung zeigt das erste von 100 Bildern der aufgenommenen Sequenz. Von der Aufnahme wurde zunächst der separat aufgenommene Untergrund subtrahiert und anschließend die Parameter **Minimum displayed value** und **Maximum displayed value** auf 0 und 250 gesetzt. Bei den Punkten, die deutlich heller sind als ihre Umgebung, handelt es sich um einzelne fluoreszierende PBI-Moleküle (siehe Fließtext).

Dieser Schluss wird bestätigt durch die Tatsache, dass infolge des Dichroiten im Strahlengang zwischen Probe und Gitterturm nur solches Licht den Detektor erreicht, dessen Wellenlänge im Bereich der Fluoreszenz von PBI liegt.

Bei Betrachtung der gesamten Sequenz fällt jedoch auf, dass nicht alle dieser hellen Punkte zu jeder Zeit sichtbar sind. Stattdessen sinkt manchmal der mittlere Grauwert im Bereich eines Moleküls innerhalb von ca. 1 s derart ab, dass das Molekül nicht mehr vom Untergrund zu unterscheiden ist. Manche Moleküle erscheinen nach ca. 10 s wieder auf dem Bild, andere tauchen in der Folge überhaupt nicht mehr auf der Aufnahme auf.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde der mittlere Grauwert im Bereich einiger dieser Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt. Hierzu wurde in *Fiji* mittels **Image > Stacks > Orthogonal Views** ein Schnitt entlang der *y*-Richtung durch das Molekül und durch die gesamte Sequenz dargestellt. Im resultierenden Bild entspricht dann die horizontale Achse der Zeit *t* und die vertikale Achse der *y*-Richtung. Aus diesem Bild wurde anschließend mit dem Werkzeug ***Rectangle*** ein Bereich derart ausgewählt, dass ein einzelnes Molekül während der gesamten Messdauer erfasst wird.¹ Mit der Funktion **Analyze > Plot Profile** wurde dann der mittlere Grauwert in diesem Bereich in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Ergebnisse dieser Auswertung für 6 verschiedene Moleküle sind in den Abbildungen 8 und 9 zu sehen.

Bei den 3 Molekülen in Abbildung 8 trat hierbei jeweils nach einer Unterbrechung von bis zu ca. 10 s wieder Fluoreszenz auf, wohingegen dies bei den Molekülen aus Abbildung 9 auch nach mindestens 30 s nicht der Fall war. Der Vergleich mit der Beschreibung in der Literatur [2, S. 1] legt daher aus unserer Sicht nahe, dass es sich beim Prozess in Abbildung 8 um *Blinking* handelt und bei Abbildung 9 um *Photobleichen*.

Laut der angegebenen Quelle findet bei beiden Prozessen der Übergang zwischen diskreten Zuständen hoher und niedriger Emissions-Wahrscheinlichkeit eines Moleküls (ein sogenannter *on-off step*) innerhalb von μ s bis second statt, was mit unserer Beobachtung vereinbar ist. Als Erklärung für Blinking wird dort u. a. die vorübergehende Besetzung von Zuständen angegeben, aus denen heraus keine Emission möglich ist. Diese Zustände entstehen z. B. durch Transfer von Elektronen.² Dieser Prozess ist reversibel. Photobleichen ist hingegen ein irreversibler Vorgang infolge chemischer Reaktionen, die durch die Einstrahlung von Licht hervorgerufen werden.

4.3.2 Polarisation der Fluoreszenz

Anschließend wurde mit denselben Einstellungen an Laser und Gitterturm wie zuvor (**Grating: Tur: 1 2, 1200 g/nm, Blz=Mirror**) eine weitere Sequenz

¹Hierzu muss der ausgewählte Bereich in *t*-Richtung genauso breit sein wie das ganze Bild. In *y*-Richtung wurden alle Pixel um einen Lichtpunkt ausgewählt, die während der Messdauer für mindestens 2 Frames sichtbar heller waren als der Untergrund.

²Aus dem Gespräch mit unserem Praktikums-Betreuer wissen wir, dass vermutlich diese Erklärung in unserem Experiment zutreffend ist.

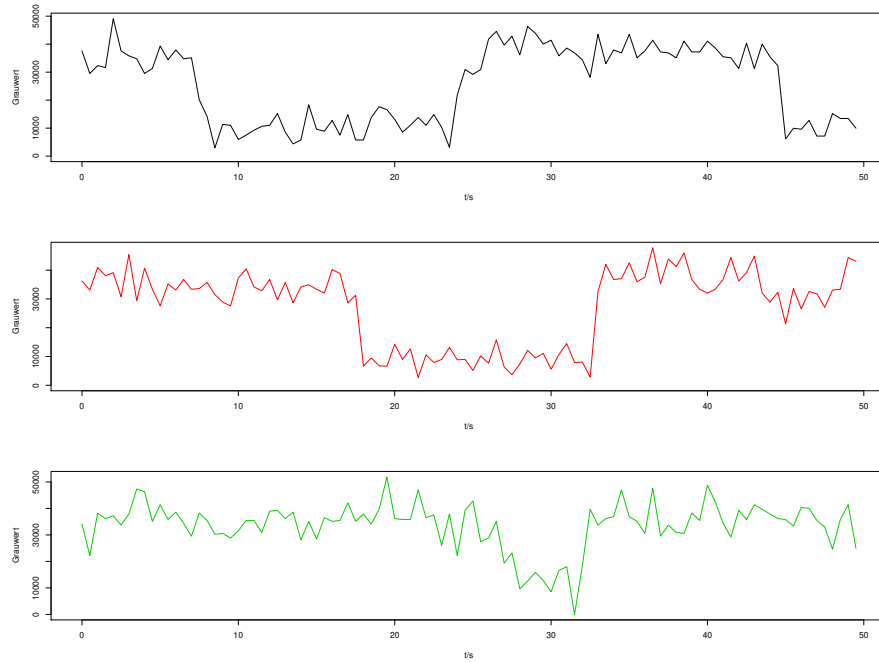


Abbildung 8: Grauwert in Abhängigkeit von der Zeit für 3 verschiedene Moleküle. Die Daten stammen aus derselben Sequenz wie Abbildung 7. In dieser wurde dazu ein Schnitt entlang der y -Richtung erstellt ($x = 340$ px, 357 px und 360 px für den oberen, mittleren und unteren Graphen) und anschließend der mittlere Grauwert im y -Bereich um ein einzelnes Molekül zeitabhängig dargestellt ($y = 121 \dots 123$ px, $361 \dots 364$ px und $27 \dots 29$ px). Zu sehen ist das sogenannte *Blinking* der Moleküle (siehe Fließtext).

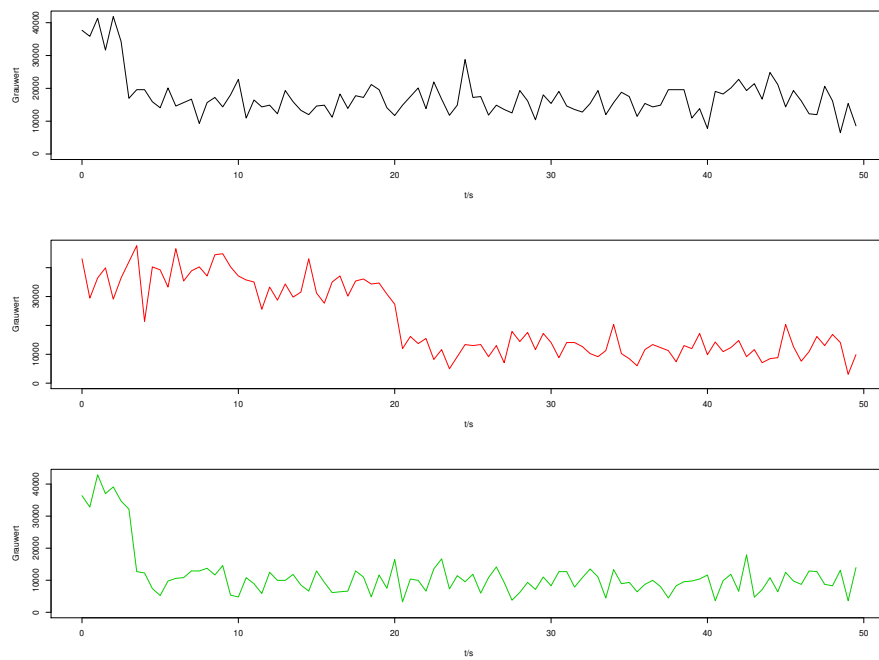


Abbildung 9: Grauwert in Abhängigkeit von der Zeit für 3 verschiedene Moleküle. Die Daten stammen aus derselben Sequenz wie Abbildung 7. Die Schnitte wurden wie in Abbildung 8 erstellt ($x = 316 \text{ px}$, 365 px und 458 px , $y = 422 \dots 425 \text{ px}$, $114 \dots 116 \text{ px}$ und $53 \dots 57 \text{ px}$). Zu sehen ist sogenanntes *Photo-bleichen* der Moleküle (siehe Fließtext).

von 100 Fluoreszenz-Bildern aufgenommen; diesmal wurde allerdings der im Abschnitt 3.1 erwähnte rotierende Polarisationsfilter in den Strahlengang eingebaut. Da der Laser linear polarisiert ist, wurde die Probe auf diese Weise mit einer elektromagnetischen Welle mit rotierender linearer Polarisation und modulierter Intensität angeregt – beides mit derselben Frequenz, mit der auch der Polarisationsfilter rotiert.

Wie beim vorherigen Versuchsteil wurde bei der Aufnahme eine Untergrund-Korrektur vorgenommen und die resultierende Sequenz mit *Fiji* nachbearbeitet; die Parameter **Minimum displayed value** und **Maximum displayed value** wurden auf die Werte 50 und 150 gesetzt.

In der Aufnahme ist bei allen sichtbaren Molekülen eine zeitliche Modulation der Helligkeit erkennbar, wobei die Moleküle zu den Zeitpunkten der niedrigsten Helligkeit nicht vom Untergrund unterscheidbar sind. Um die Modulation genauer zu untersuchen, wurde an der Aufnahme wie im vorherigen Abschnitt der Grauwert im Bereich dreier Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.

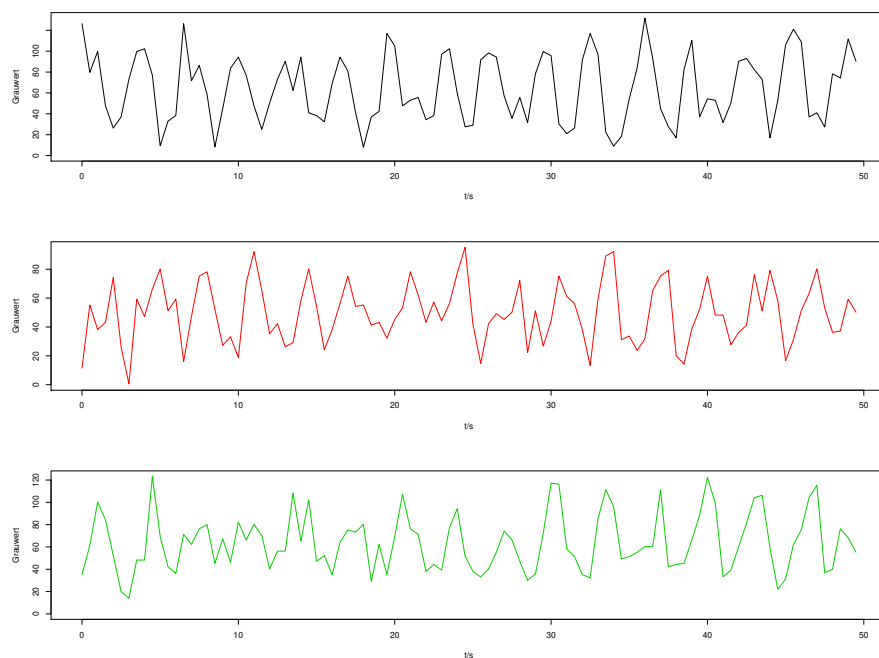


Abbildung 10: Grauwert in Abhängigkeit von der Zeit für 3 verschiedene Moleküle. Der Schnitt wurde wie in Abbildung 8 erstellt ($x = 311 \text{ px}$, $y = 172 \dots 174 \text{ px}$, $227 \dots 230 \text{ px}$ und $267 \dots 270 \text{ px}$). Bei der Messung wurde ein rotierender Polarisationsfilter in den Strahlengang zwischen Lichtquelle und Probe eingebaut.

In dieser Abbildung ist die Periodische Modulation erkennbar; um sie genauer quantifizieren zu können, wurde eine Fourier-Transformation dieser Daten durchgeführt. Deren Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

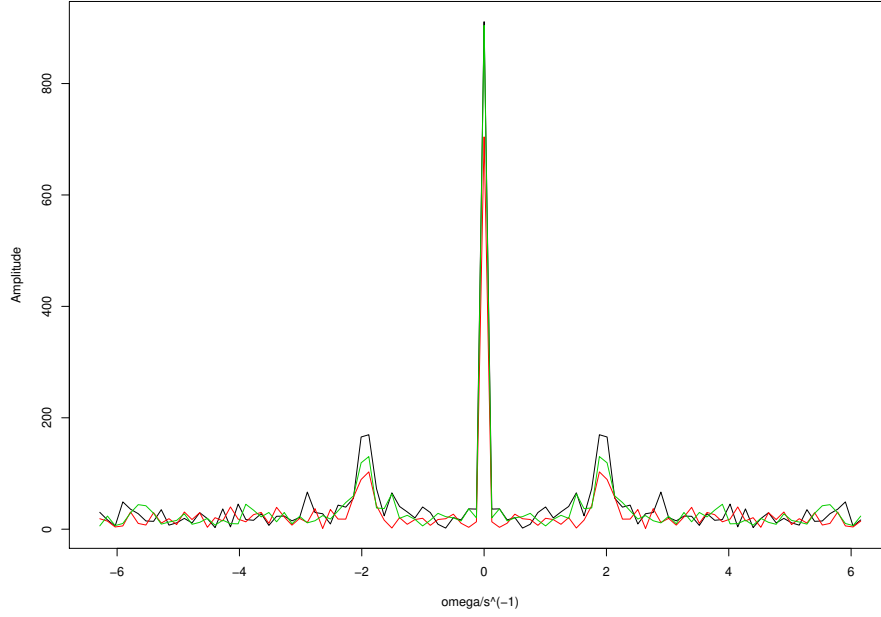


Abbildung 11: Amplituden des Frequenzspektrums der drei zeitabhängigen Signale in Abbildung 10. Bei allen drei Datensätzen tritt die höchste Amplitude für nichtverschwindende Frequenzen bei $\omega \approx 1,88 \text{ s}^{-1}$ auf. Die zugehörigen Phasen (nicht dargestellt) unterscheiden sich deutlich, was darauf schließen lässt, dass die drei untersuchten Moleküle in der Probe unterschiedlich orientiert sind (siehe Fließtext).

Bei allen drei Datensätzen tritt die höchste Amplitude für nichtverschwindende Frequenzen bei $\omega = 1,884956 \text{ s}^{-1}$ auf. Mit der Abschätzung der Unsicherheit $s_\omega = \frac{2\pi}{T}$ durch die Frequenz-Auflösung bei einer Messdauer $T = 50 \text{ s}$ ergibt sich damit eine Periode von

$$T = (3,33 \pm 0,07) \text{ s.}$$

Die zugehörigen Phasen für die erste, zweite und dritte Messung betragen 0,75, -1,38 und -0,71 und unterscheiden sich somit deutlich.³ Dies bedeutet, dass die drei untersuchten Moleküle zu unterschiedlichen Zeiten (und damit für unterschiedliche Stellungen des Polarisationsfilters, d. h. unter unterschiedlichen

³Die Differenz zwischen den Phasen ist außerdem kein Vielfaches von π .

Polarisationen des einfallenden Lichts) maximale Fluoreszenz zeigen. Wenn davon ausgegangen werden kann, dass die Quantenausbeute nur von der relativen Ausrichtung des Moleküls zum einfallenden Licht abhängt, folgt daraus, dass die drei Moleküle in der Probe unterschiedliche Orientierungen besitzen. Da die Probe nicht kristallin, sondern (infolge der Herstellungsweise) amorph ist, erscheint dies nicht überraschend. Bemerkenswert finden wir jedoch, dass mit der verwendeten Methode überhaupt Aussagen über die Ausrichtung einzelner Moleküle getroffen werden können.

4.4 Auswertung von Spektren

4.5 Einzelmolekülspektren von Perylenbisimid (PBI)

Folgendes Kapitel befasst sich mit dem Wellenlängenspektrum einzelner PBI Moleküle. Es werden die Wellenlängen einzelner Übergänge bestimmt sowie deren Energiedifferenzen. Zudem wird das Ensemblespektrum mit den Einzelmolekülspektren sowie Histogrammen der Übergänge verglichen. Insgesamt wurden 19 Spektren gemessen und mit ImageJ bearbeitet. Für die Auswertung wurden 16 Spektren verwendet, da einige Messungen ein zu hohes Signal-Rausch Verhältnis aufweisen. Generell wurde nach jeder Einzelmessung an der gleichen Stelle mit dem Laser ein Untergrundspektrum aufgenommen. Wieder wurden mit der Funktion Z Stack ein mittleres Spektrum erstellt, jeweils von der Einzelmessung sowie vom Untergrund. Das Spektrum eines PBI Moleküls wurde anschließend um den jeweiligen Untergrund korrigiert. Alle Spektren wurden mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 600\text{ nm}$ sowie einer Laserleistung von $0,05\text{ mW}$ vermessen. Für die grafische Darstellung der Spektren wurden die Rohdaten, also Pixel gegenüber Intensität, wie in Kapitel 4.2 beschrieben in Wellenlängen umgerechnet. Zunächst sollen die Wellenlängen der Übergänge von $0^* \rightarrow 0$, $0^* \rightarrow 1$ sowie $0^* \rightarrow 2$ bestimmt werden. Dies erfolgt über die Bestimmung der Peakpositionen der einzelnen Emissionsspektren der PBI Moleküle. Generell weist das Spektrum eines PBI Moleküls mehrere Peaks auf. Jeder Peak entspricht einem Fluoreszenzübergang, welcher unterschiedliche Wellenlängen haben kann. Hierbei entspricht der Peak mit der höchsten Intensität einem energetischen Übergang von $0 \rightarrow 0$, der Peak mittlerer Intensität einem Übergang von $0 \rightarrow 1$ sowie der schwächste Peak dem Übergang von $0 \rightarrow 2$. Die Peakposition des Übergangs von $0 \rightarrow 2$ konnte nicht vermessen werden, da die Filterkante im Setup das Emissionssignal blockiert, bevor der Peak vermessen werden kann. Für die Bestimmung der Peakposition, d. h. der Wellenlänge der einzelnen Übergänge, wurde daher eine Summe aus zwei Gaußkurven mithilfe eines Pythonprogramms an jedes einzelne Molekülspektrum gefittet und die Peakposition der Gauß-Kurven bestimmt. Aus allen 16 Spektren wurde ein Mittelwert der Peakpositionen errechnet. Die Ergebnisse der Übergänge sowie die Darstellung einiger Spektren sind in Tabelle 1 sowie in Abb. 13 gezeigt. Bei Vergleich mit der Literatur (siehe auch Abb. 12) fällt auf, dass die erwartete Peakposition stark von unserer ermittelten Position der jeweiligen Übergänge abweicht. Dies resultiert vermutlich aus dem Setup.

Tabelle 1: Spektraler Mittelwert der Peakpositionen bei Fluoreszenzübergängen einzelner PBI Moleküle in Toluol gegenüber Literaturwerten

Übergang	Wellenlänge λ in nm	Literaturwert aus [3]
$0^* \rightarrow 0$	$(545,51 \pm 5,53)$ nm	533 nm
$0 \rightarrow 1$	$(584,73 \pm 7,18)$ nm	572 nm

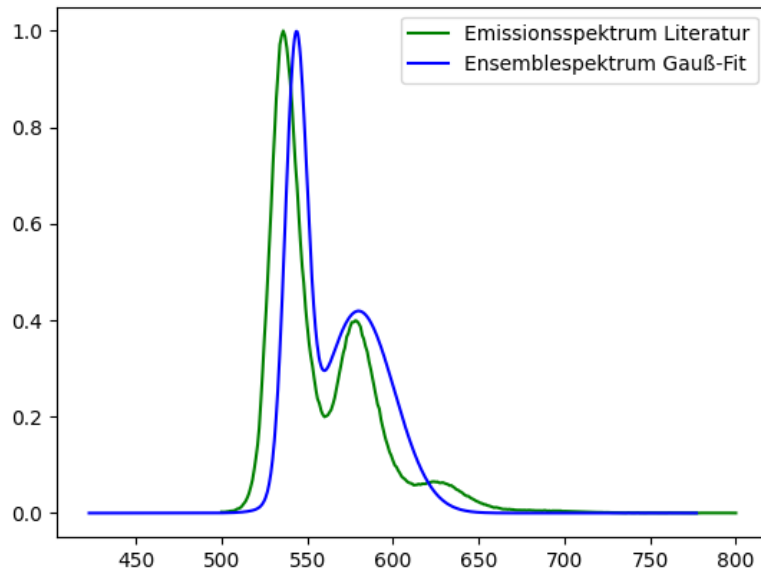


Abbildung 12: Gauß-Fit des Ensemblespektrums (blau) von 16 ausgewerteten PBI Einzelmolekülspektren gegenüber dem Emissionsspektrum aus der Literatur [3] (grün); zu erkennen ist eine Abweichung der spektralen Peaks beider Spektren

Nun können mithilfe der ermittelten Übergangswellenlängen von PBI Molekülen die energetischen Abstände $\Delta E_{i,j}$ berechnet werden. Aufgrund der Proportionalität zwischen Energie E und Wellenzahl $\bar{\nu}$ kann folgender Zusammenhang für die Berechnung verwendet werden:

$$\frac{\Delta E_{i,j}}{hc} = \left(\frac{1}{\lambda_i} - \frac{1}{\lambda_j} \right) \cdot \frac{1}{n_{Luft}} \quad (10)$$

wobei der Brechungsindex $n_{Luft} = 1,00028$ beträgt. Wir erhalten das Ergebniss

$$\frac{\Delta E_{0,1}}{hc} = (1229,2 \pm 24,2) \frac{1}{\text{cm}}. \quad (11)$$

Um sich über die Häufigkeit der Übergänge einen Überblick zu verschaffen, dient Abb. 14. Das Histogramm zeigt die Wellenlängen der einzelnen Übergänge der jeweiligen Einzelmolekülspektren sowie das Ensemblespektrums. Um das Ensemblespektrum zu erstellen, wurden alle Datenpunkte der Einzelmessungen addiert und normiert. Die x-Achse wurde wieder mit der Kalibrationsgeraden in Wellenlängen umgerechnet. Erkennlich ist, dass die Häufigkeit der Übergänge von $0^* \rightarrow 0$ überwiegt gegenüber des Übergangs $0 \rightarrow 1$. Dies lässt darauf schließen, dass der Überlapp zwischen den Kernwellenfunktionen bei $E_{0,1}$ am höchsten und der Übergang somit am wahrscheinlichsten ist (siehe Franck-Condon-Prinzip).

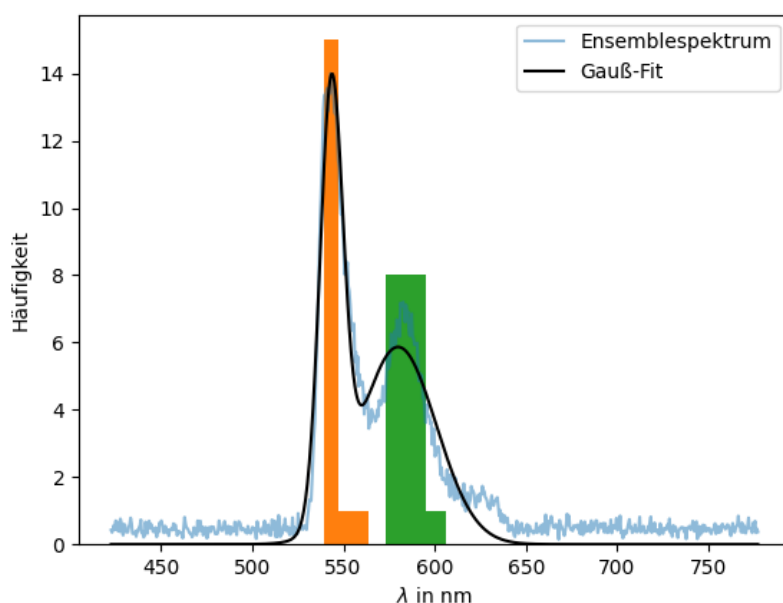
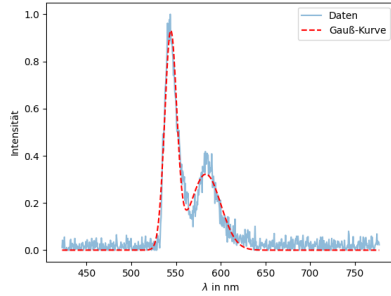
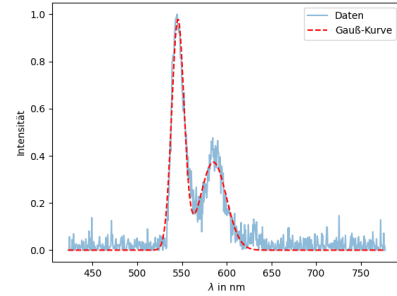


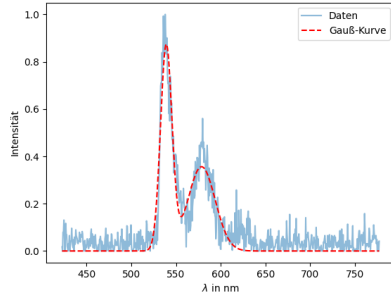
Abbildung 14: Ensemblemessung von 16 PBI Einzelmolekülmessungen aufsummiert und normiert (blau); Gauß-Fit des Ensemblespektrums (schwarz) von 16 ausgewerteten PBI Einzelmolekülspektren, Histogramm der spektralen Peakpositionen der Einzelmolekülmessungen; Peakposition des Übergangs $0^* \rightarrow 0$ (orange) sowie $0 \rightarrow 1$ (grün)



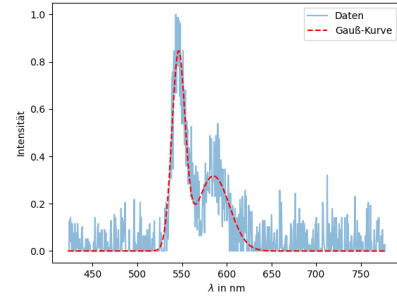
(a) Uhrzeit: 14:24; Belichtungszeit: 37,5 s; Bilder Messung: 75; Bilder Hintergrund: 10



(b) Uhrzeit: 14:27; Belichtungszeit: 54 s; Bilder Messung: 108; Bilder Hintergrund: 10



(c) Uhrzeit: 13:56; Belichtungszeit: 18,5 s; Bilder Messung: 37; Bilder Hintergrund: 10



(d) Uhrzeit: 13:59; Belichtungszeit: 25 s; Bilder Messung: 50; Bilder Hintergrund: 10

Abbildung 13: Einzelmolekülspektren eines PBI Moleküls in einer Polysterolmatrix; Auftragung der normierten Intensität der Messdaten (blau) gegenüber der Wellenlänge mithilfe der Kalibrationsgeraden; Fit Funktion (rot gestrichelt) bestehend aus der Summe zweier Gauß-Funktionen; Peak mit höherer Intensität zeigt den Übergang $0^* \rightarrow 0$; Peak mit geringerer Intensität zeigt Übergang $0 \rightarrow 1$; Übergang $0 \rightarrow 2$ ist aufgrund der Filterkante schwer zu erkennen

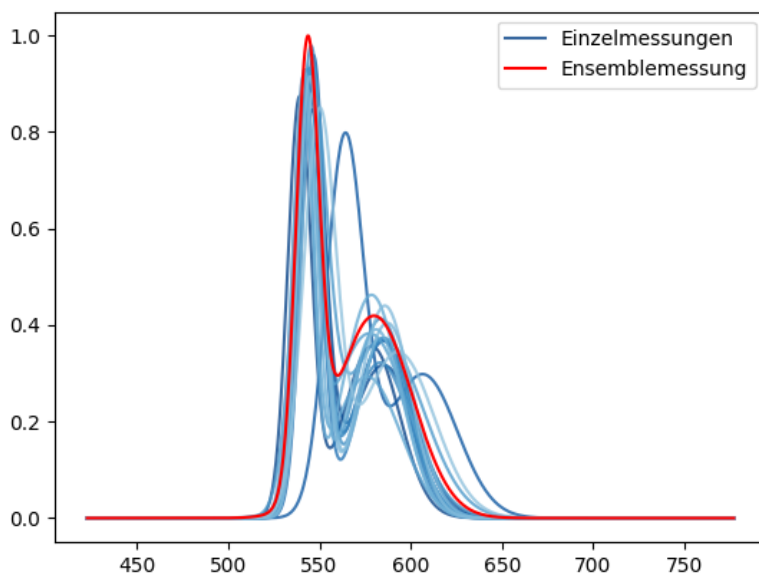


Abbildung 15: Gauß-Kurven von 16 PBI Einzelmolekülmessungen in verschiedenen blautönen; Gauß-Kurve der Ensemblemessung (rot), welche die normierte Summe der Messdaten von 16 Einzelmessungen entspricht

5 Fazit

Der vorliegende Praktikumsversuch hat uns neue Einblicke in das Verhalten der Materie auf der Ebene einzelner Moleküle vermittelt. Zwar hatten wir bereits zuvor Prozesse wie Fluoreszenz und Photobleichen beobachten können – jedoch bislang nur bei ganzen Ensembles von Molekülen. Nach den in dieser Ausarbeitung beschriebenen Experimenten haben wir nun ein tieferes Verständnis von den mikroskopischen Prozessen, die diesen Effekten zugrunde liegen. Mit dem Blinking sind wir sogar mit einem Prozess in Berührung gekommen, der bisher nicht allen von uns bekannt war. Auch nach nach längerer Beschäftigung mit dem Thema der Einzelmolekülspektroskopie fasziniert uns, dass wir mit dieser Methode Prozesse in Größen- und Zeitskalen beobachten konnten, die sich der alltäglichen Erfahrung komplett entziehen.

Abgesehen konnten wir beim Praktikumsversuch auch Erfahrungen mit der Präparation von Proben im Labor sowie der Anwendung verschiedener computergestützter Auswertungs-Methoden wie digitaler Bildbearbeitung, Fit von Messdaten oder Erstellung von Frequenzspektren sammeln. Insgesamt konnten wir also viel aus dem Versuch mitnehmen und blicken zufrieden darauf zurück.

6 Literatur

- [1] Torsten Fließbach. *Statistische Physik*. Mannheim Leipzig Wien Zürich: BI-Wiss.-Verl, 1993. 440 S. ISBN: 978-3-411-16071-6.
- [2] Thomas Gensch, Martin Böhmer und Pedro F. Aramendía. »Single Molecule Blinking and Photobleaching Separated by Wide-Field Fluorescence Microscopy«. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 109.30 (4. Aug. 2005), S. 6652–6658. ISSN: 1089-5639, 1520-5215. DOI: 10.1021/jp0510847. URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp0510847> (besucht am 19.06.2023).
- [3] Uwe Gerken. »Einzelmolekülspektroskopie«.
- [4] Hermann Haken und Hans Christoph Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. ISBN: 978-3-662-08827-2 978-3-662-08826-5. DOI: 10.1007/978-3-662-08826-5. URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-08826-5> (besucht am 10.06.2023).
- [5] *HotPixels Eliminator*. URL: <https://www.mediachance.com/digicam/hotpixels.htm> (besucht am 19.06.2023).
- [6] Dieter Meschede, Christian Gerthsen und Helmut Vogel, Hrsg. *Gerthsen Physik*. 25. Auflage. Springer-Lehrbuch. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum, 2015. 1047 S. ISBN: 978-3-662-45976-8. DOI: 10.1007/978-3-662-45977-5.
- [7] *Point spread function*. In: *Wikipedia*. Page Version ID: 1141255328. 24. Feb. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Point_spread_function&oldid=1141255328 (besucht am 10.06.2023).
- [8] »Quantenmechanische Berechnung von angeregten Zuständen: Absorption und Fluoreszenz«. In: (). URL: https://www.ipc.kit.edu/download/C3_2018.pdf (besucht am 10.06.2023).