

DIE TIRF-MIKROSKOPIE ALS WERKZEUG DER EINZELMOLEKÜLCHEMIE

—

UNTERSUCHUNGEN AN DER GRENZFLÄCHE FEST/GASFÖRMIG & FEST/FLÜSSIG

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Matthias Jourdain, M.Sc.

Saarbrücken

2025

Tag des Kolloquiums:	13.02.2026
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre
Berichterstatter:	Prof. Dr. Gregor Jung Prof. Dr. Marc Schneider
Vorsitz:	Prof. Dr. Johann Jauch
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Christoph Zollitsch

Wer Pläne macht, wird ausgelacht

Johann König

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen, bei denen ich mich an dieser Stelle kurz bedanken möchte.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Gregor Jung, für die hervorragende Betreuung schon seit der Masterarbeit bedanken. Mit viel Geduld, Unterstützung und kritischem Hinterfragen hat er mich nicht nur wissenschaftlich begleitet, sondern auch in schwierigen Momenten motiviert.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Prof. Dr. Marc Schneider, für das Interesse an meiner Arbeit und die Begutachtung.

Danke an alle Mitarbeiter des AK Jung, mit denen ich über die Jahre zusammenarbeiten durfte. Danke für die gute Stimmung, gegenseitige Unterstützung und vielen Erlebnisse und Aktionen. Besonderer Dank an Sascha fürs Korrekturlesen und die zahlreichen wissenschaftlichen (und nicht-wissenschaftlichen) Diskussionen, sowie an Johannes für die Unterstützung beim Einstieg in die Einzelmolekülspektroskopie.

Ebenfalls besonders dankbar bin ich meiner Familie und meinen Freunden, auf die ich auch abseits des Studiums und der Promotion immer zählen konnte.

Vielen Dank an Yvonne und Mats. Ihr habt mir den Rückhalt gegeben, den ich gebraucht habe, um diese Aufgabe zu bewältigen.

Danke Papa, diese Arbeit ist für dich.

Zusammenfassung

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt ein einzigartiges Werkzeug für die Untersuchung elementarer Prozesse aus der Biologie, Chemie, Biophysik und Medizin dar. Über die Jahrzehnte haben sich spezielle Techniken etabliert, die die Untersuchung von chemischen Reaktionen auf dem Einzelmolekülniveau erlauben und damit Dynamiken aufschlüsseln, die durch die inhärente Mittelung von Informationen im Ensembleexperiment unentdeckt bleiben. Besonders die TIRF-Mikroskopie eignet sich mit guten Signal-zu-Untergrund Verhältnissen dazu, über ein großes Sichtfeld Einzelmolekülsysteme an einer Grenzfläche zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wird diese dazu verwendet, anhand zweier ausgewählter Fluoreszenzfarbstoffe Reaktionen auf dem Einzelmolekülniveau zu verfolgen und zu analysieren. Dabei wurde Terrylen als bekannter Vertreter kondensierter Aromaten in der Einzelmolekülspektroskopie ausgewählt. Bei der Untersuchung der Photooxidation dieser Verbindung in kristallinem *p*-Terphenyl konnten neue Erkenntnisse bezüglich des Reaktionsmechanismus erlangt werden, die einen zusätzlichen Reaktionspfad zu den Zersetzungsprodukten ohne vorausgehenden Dunkelzustand implizieren. Für die Photosäure HPDE-APTES wurde die Schützung der Hydroxylfunktion mit Silylethern in Acetonitril im Ensemble optimiert, im Anschluss auf das Einzelmolekülniveau transferiert und mittels TIRF-Mikroskopie untersucht. Dabei konnte sowohl die Hin- als auch Rückreaktion an denselben Einzelmolekülen beobachtet werden.

Abstract

Fluorescence microscopy is a unique tool that provides insights into elementary processes from biology, chemistry, biophysics and medicine. Specialized techniques have been established over the years that allow for the investigation of chemical reactions at the single-molecule level and thus elucidate dynamics that remain undetected by the inherent averaging of information in the ensemble experiment. In particular, TIRF microscopy is suitable for studying single-molecule systems at an interface with good signal-to-noise ratios over a large field of view. In the present work, this is used to track and analyze reactions at the single-molecule level using two selected fluorescent dyes. Terrylene was selected as a well-known representative of polycyclic aromatics in single-molecule spectroscopy. By investigating the photooxidation of this compound in crystalline *p*-terphenyl, new insights into the reaction mechanism could be obtained, which imply an additional reaction pathway which leads to the decomposition products without a preceding dark state. For the photoacid HPDE-APTES, the protection of the hydroxyl function with silyl ethers in acetonitrile was first optimized in the ensemble experiment, subsequently transferred to the single molecule level and investigated by TIRF microscopy. Both the forward and reverse reactions could be observed on the same individual molecules.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Beiträge in Fachzeitschriften

- R. Mhanna, J. Berger, M. Jourdain, S. Muth, R. J. Kutta, G. Jung, *Effect of Excitation Wavelength in Single-Molecule Photochemistry of Terrylene*, ChemPhysChem **2025**, e202400996. <https://doi.org/10.1002/cphc.202400996>
- C. Hoffmann, M. Jourdain, A. Grandjean, A. Titz, G. Jung, *β -Boronic Acid-Substituted Bodipy Dyes for Fluorescence Anisotropy Analysis of Carbohydrate Binding*, Anal. Chem. **2022**, 94, 16, 6112–6119. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04654>
- J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, *Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry*, Langmuir **2019**, 35, 7, 2506–2516. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03603>
- L. Wirtz, M. Jourdain, V. Huch, M. Zimmer, A. Schäfer, *Synthesis, Structure, and Reactivity of Disiloxa[3]tetrelocenophanes*, ACS Omega **2019**, 4, 19, 18355–18360. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02605>

Vorträge

- *Observation of terrylene oxidation steps with objective-type TIRF*, Central European Conference on Photochemistry CECP **2022**, Bad Hofgastein, Österreich

Poster

- *Steering the orientation of single molecule emitters*, International Bunsen Discussion Meeting **2019**, Höchst im Odenwald, Deutschland
- *Photostability by TIRF-Microscopy*, 15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence **2017**, Brügge, Belgien

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	3
2	Theoretische Grundlagen.....	5
2.1	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	5
2.2	Detektion von Einzelmolekülen.....	8
2.3	Mikroskopiemethoden zur Abbildung von Einzelmolekülen	11
2.4	Interne Totalreflektionsmikroskopie und ihre Anwendung zur Einzelmoleküldetektion	16
2.5	Reaktionsverfolgung an Einzelmolekülen mit TIRFM.....	19
2.6	Orientierung von Fluoreszenzemitern und der Spezialfall Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl	22
2.7	Photobleichen und die Rolle von Sauerstoff.....	25
2.8	Die Photooxidation von Terrylen und vergleichbaren Aromaten	27
2.9	Photosäuren und Schutzgruppenchemie – Sonden für die Reaktionsverfolgung im Zweifarbensystem	30
3	Ergebnisse & Diskussion.....	35
3.1	Die Photooxidation von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl – Modellsystem für die Grenzfläche Fest/Gasförmig.....	35
3.1.1	Charakterisierung im Ensemble.....	35
3.1.2	Optimierung der Probenvorbereitung.....	36
3.1.3	Detektion und Charakterisierung auf dem Einzelmolekülniveau	39
3.1.4	Überlegungen zur Detektion der Photooxidation auf dem Einzelmolekülniveau.....	43
3.1.5	Untersuchung der Photooxidation mittels o-TIRF-Mikroskopie.....	47
3.1.6	Untersuchungen zur spektralen Zuordnung der Photoprodukte	55
3.1.7	Clusteranalyse.....	58
3.1.8	Weitere Beobachtungen.....	62
3.2	Photosäuren als dual-emissive Sonden auf der Einzelmolekülebene – Modellsystem für die Grenzfläche Fest/Flüssig	66
3.2.1	Charakterisierung der Schutzgruppenreaktion im Ensemble.....	66
3.2.2	Überlegungen zum Transfer auf das Einzelmolekülniveau	74
3.2.3	Silylschutzgruppenchemie im o-TIRF mit HPDE-APTES	77
4	Experimenteller Teil.....	84
4.1	Spektroskopie im Ensemble.....	84
4.2	Experimentelles zur TIRF-Mikroskopie	85
4.2.1	Säuberung von Probenträgern.....	85
4.2.2	Prismenbasierte TIRF-Mikroskopie	85
4.2.3	Objektivbasierte TIRF-Mikroskopie	86
4.2.4	TIRF-Mikroskopie für die Photooxidation von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl	87
4.2.5	TIRF-Mikroskopie für Photosäuren als dual-emissive Sonden.....	89

4.3	Extraktion, Verarbeitung und Auswertung von Daten.....	91
4.3.1	Allgemeine Vorgehensweise	91
4.3.2	Datenverarbeitung zur Photooxidation von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl.....	92
4.3.3	Datenverarbeitung zur Silylschutzgruppenchemie von Photosäuren	96
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	97
6	Literaturverzeichnis.....	99
7	Anhang	I
7.1	Ergänzende Abbildungen und Mikroskopiebilder	I
7.1.1	Allgemeine Ergänzungen.....	I
7.1.2	Ergänzungen zur Photooxidation von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl	IV
7.1.3	Ergänzungen zu Photosäuren als dual-emissive Sonden auf der Einzelmolekülebene ...	XI
7.2	Verwendete Chemikalien.....	XIII
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	XIV
7.4	Tabellenverzeichnis	XVIII
7.5	Abkürzungsverzeichnis.....	XIX

1 Einleitung und Zielsetzung

Bereits seit über 30 Jahren besteht, vor allem in Physik, Chemie und Biologie, das Interesse daran, einzelne Moleküle durch Spektroskopie im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie (engl. *single molecule spectroscopy*, SMS) nachzuweisen und zu studieren. Im Laufe der Jahre haben sich zahlreiche leistungsfähige und nützliche Methoden sowie experimentelle Strategien etabliert, um molekulare Strukturen, Mechanismen und Funktionen aufzudecken, die durch die inhärente Mittelung in Experimenten im Ensemble unaufklärbar wären^[1–4]. Solche Methoden stellen nicht nur für die Grundlagenforschung wichtige Werkzeuge dar, sondern konnten bereits direkt in Anwendungen überführt werden, zum Beispiel durch die Entwicklung von Einzelmolekülbiosensoren^[5] und Einzelpartikelverfolgung (engl. *single-particle tracking*, SPT)^[6]. Diese können zur Detektion wichtiger Biomoleküle *in vitro* und *in vivo* in Echtzeit genutzt werden und bieten neue Möglichkeiten zur Früherkennung von Krankheiten und in der personalisierten Medizin^[5]. Die Geschichte der Einzelmolekülspektroskopie basiert auf ersten Erfolgen in den Jahren 1989 und 1990, in denen, zunächst bei tiefen Temperaturen, die Absorption^[7] und Fluoreszenz^[8] von einzelnen Pentacen-Molekülen in kristallinem *p*-Terphenyl aufgenommen werden konnten. Vor allem wegen des besseren Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) basierten die meisten Studien fortan auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals. Seit diesen ersten Studien hat sich das Gebiet rasant entwickelt und heutzutage stehen diverse Technologien und Methoden zur Einzelmoleküldetektion, auch bei Raumtemperatur, zur Verfügung^[9], die vor allem die Fluoreszenzmikroskopie revolutioniert haben. Beispielhaft seien hier die Entwicklung hochauflösender Mikroskopiemethoden wie PALM^[10], STORM^[11] und PAINT^[12] genannt, mit denen unter anderem die Verfolgung der Bewegung einzelner Moleküle in Zellen möglich ist^[13,14]. Inzwischen können hochaufgelöste, vibronische Spektren durch Kombination von Einzelmolekülanregungsspektroskopie mit stimulierter Emissionsunterdrückung (engl. *stimulated emission depletion*, STED)^[15] aufgenommen werden. Cryo-Einzelmolekülspektroskopie ermöglicht die Untersuchung von Stickstoff-Fehlstellen-Zentren (NV-Zentren) in Diamanten^[16] und von Null-Phononen-Übergängen, die als ultrasensitive Sonde für nanoskalige Vorgänge dienen können^[17].

Für die Untersuchung einzelner Fluoreszenzmoleküle und deren photophysikalischer Parameter haben sich vor allem in den 1990er Jahren kristalline Wirt-Gast-Systeme aus polyzyklischen Aromaten, wie den bereits erwähnten Pentacen oder Terrylen in *p*-Terphenyl, etabliert^[18,19]. Durch die einhergehende Immobilisierung und Orientierung ergeben sich besondere Vorteile in der Probenpräparation und die Farbstoffe zeichnen sich durch hohe (Photo-)Stabilität und hohe Signalstärken aus. Die Übertragung von Reaktionen aus der nasschemischen Synthese, zu deren Untersuchung und Aufklärung in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten, bringt dagegen zusätzliche Herausforderungen mit sich - hauptsächlich in Bezug auf die Reinheit der Proben, die Zugabe von Reaktanden und technischer Realisierung, z.B. durch mikrofluidische Systeme^[20].

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe beider Arten der Probenpräparation neue Einsichten in chemische Reaktionen und physikochemische Prozesse auf dem Einzelmolekülniveau erlangt werden. Hierzu werden an Modellsystemen und etablierten Farbstoffsystemen neue experimentelle Strategien zur Verfolgung chemischer Reaktionen auf Basis der TIRF-Mikroskopie entwickelt. Zum einen wird an der Grenzfläche fest/gasförmig die Photooxidation von Terrylen in *p*-Terphenyl und zum anderen die Silylschutzgruppenchemie von Photosäuren an der Grenzfläche fest/flüssig untersucht. In Kapitel 2 werden zunächst die theoretischen Grundlagen der verwendeten Methoden und photophysikalischen Prozesse sowie der aktuelle Kenntnisstand bezüglich Reaktionsverfolgung in der SMS vorgestellt. Kapitel 3 behandelt die Ergebnisse aus den Untersuchungen der beiden Modellsysteme und diskutiert diese im Kontext des bisherigen Kenntnisstands. In Kapitel 4 werden der experimentelle Aufbau der verwendeten optischen Systeme sowie die Probenpräparation und die Datenverarbeitung beschrieben. Eine Zusammenfassung und ein Ausblick in Kapitel 5 stellen den wissenschaftlichen Abschluss der Arbeit dar.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Grundvoraussetzung und Basis optischer Methoden ist stets die Interaktion von Materie mit elektromagnetischer Strahlung. Für organische Chromophore liegen die Anregungs- und Detektionswellenlängen meist im sichtbaren Bereich zwischen 400-700 nm sowie teilweise im angrenzenden UV-(~200-400 nm) und NIR-Bereich (~700-1000 nm). Diese Grenzen ergeben sich durch photochemische Zersetzung unterhalb von 200 nm sowie die zunehmende Konkurrenz durch nicht-strahlende Prozesse im langwelligen Absorptionsbereich ^[21,22]. Typischerweise werden im sichtbaren Bereich Anhebung und Rückkehr von Elektronen aus dem höchsten besetzten Orbital (engl. *highest occupied molecule orbital*, HOMO) in das niedrigste unbesetzte Orbital (engl. *lowest unoccupied molecule orbital*, LUMO) eines Moleküls im Singulettzustand beobachtet. Die, in Folge der Rückkehr in den Ausgangszustand, emittierte Strahlung wird Fluoreszenz genannt und stellt das zugrundeliegende Phänomen fluoreszenzspektroskopischer Methoden dar. Solche Übergänge sind meist stark und finden unter Beteiligung von π -Orbitalen von konjugierten Systemen statt ^[23,24].

Damit elektronische Übergänge stattfinden können, müssen gewisse experimentelle Anforderungen erfüllt sein. Die Resonanzbedingung verlangt, dass die Frequenz ν der Anregungsstrahlung, und somit ihre Energie, so groß ist wie die energetische Distanz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand (Gleichung (1)). Somit werden nur passende Wellenlängen zu Übergängen absorbiert und alle weiteren entweder transmittiert oder gestreut. Die Farbe der Verbindung wird folglich durch die Kombination aus Transmission, Streuung und Emission bestimmt ^[22,24].

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

Weitere Bedingungen werden durch das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{12}$ und, in Relation, die dreidimensionale Wahrscheinlichkeitsdichte der Elektronen im Molekül vorgegeben. Diese wird durch die Wellenfunktionen ψ_2 und ψ_1 des angeregten respektive Grundzustands in Gleichung (2) beschrieben:

$$\vec{\mu}_{21} = \int \psi_2^*(\vec{r}) e\vec{r} \psi_1(\vec{r}) dV \quad (2)$$

Eine Anhebung in den angeregten Zustand geht mit einer Umverteilung der elektronischen Wahrscheinlichkeitsdichte einher. Optische Übergänge sind nur möglich für $\vec{\mu}_{21} \neq 0$. Graphisch kann die Umverteilung näherungsweise dargestellt werden, indem die Molekülorbitale aus Linearkombinationen der Atomorbitale konstruiert werden und die Vorzeichen der Orbitale im Ausgangs- und Endzustand multipliziert werden ^[24]. Beispielhaft für den Aromaten Terrylen ist dies in Abbildung 1 dargestellt.

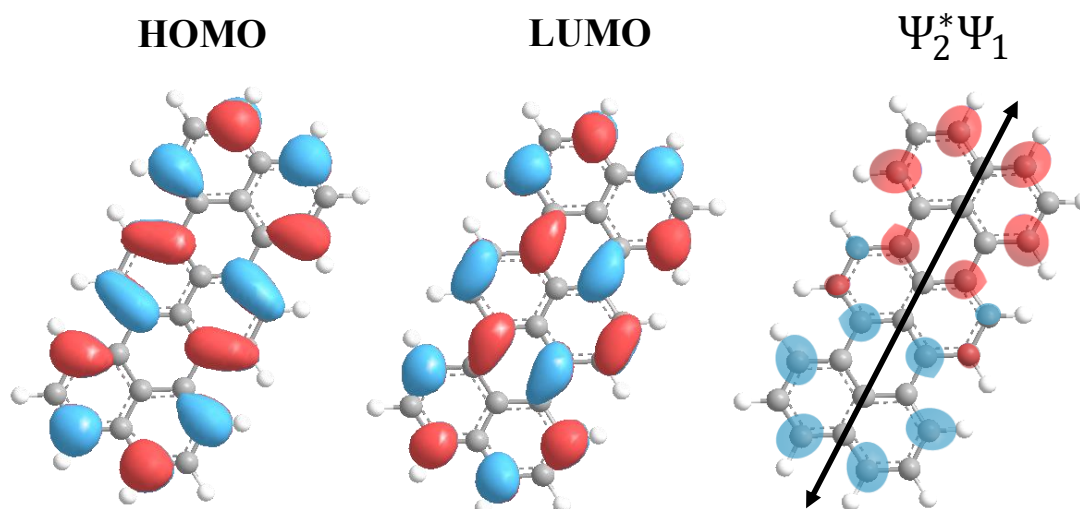


Abbildung 1: Schematische Abbildung des HOMO und LUMO von Terrylen sowie Näherung der Übergangsdichte $\psi_2^*\psi_1$. Die Richtung des Übergangsdipolmoments wird mit einem Doppelpfeil dargestellt (HOMO/LUMO generiert in ChemDraw 3D, Berechnungsmethode „Extended Hückel“).

Die erhaltene Übergangsdichte zeigt die Richtung des Übergangsdipolmoments an. Die Wahrscheinlichkeit der Anregung hängt nun direkt von der Fähigkeit des oszillierenden E-Feldes ab, mit den Molekülorbitalen so zu wechselwirken, dass der angeregte Zustand erreicht werden kann. Für eine optimale Wechselwirkung und somit höchste Übergangswahrscheinlichkeit, muss das Übergangsdipolmoment parallel zum Polarisierungsvektor der elektrischen Komponente des Anregungslichts orientiert sein. Die Übergangswahrscheinlichkeit und somit Intensität des spektralen Übergangs, besitzt eine quadratische Abhängigkeit vom Absolutwert des Übergangsdipolmomentvektors und reduziert sich bei nicht optimaler Ausrichtung abhängig vom Einstrahlungswinkel. Bei senkrechter Ausrichtung sinkt sie auf null. Die gleichen Überlegungen gelten für den Prozess zur Rückkehr in den Grundzustand ^[24]. Für das Auftreten von Fluoreszenz ist zudem das Vorhandensein eines starren Molekülgerüsts günstig, das vor allem in aromatischen Systemen gegeben ist ^[22,25]. Die effektive Fläche, mit der das Molekül Licht absorbieren kann, lässt sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ableiten und wird als Absorptionsquerschnitt σ bezeichnet, der von der Stoffkonstante ϵ_λ , dem molaren Extinktionskoeffizient, abhängt. Die Übergangswahrscheinlichkeit steigt proportional mit der Ausdehnung dieser Fläche. Typische Werte liegen im Bereich von wenigen $\text{\AA}^2$ ^[25,26]. Multipliziert mit der Anzahl an Photonen, die pro Fläche und Zeit eingestrahlt werden, lässt sich daraus die Anregungsrate k_{12} berechnen.

$$\sigma = 2.303 \frac{\epsilon_\lambda}{N_A} = 3.82 \cdot 10^{-21} \epsilon_\lambda \quad (3)$$

$$k_{12} = \sigma * \frac{I_{exc}}{h\nu} \quad (4)$$

Bei Spektroskopie in flüssigem oder gasförmigem Medium mitteln sich die Orientierungen der einzelnen Übergangsdipolmomente durch Rotationsdiffusion und die relative Orientierung des Emitters zum Anregungslicht verliert im Ensemble ihre Bedeutung. Das Molekül agiert als isotroper Emmitter ^[27].

In festen Medien, wie z.B. Kristallen, kann die Ausrichtung des Übergangsdipolmoments jedoch eine maßgebliche Rolle spielen. Unter den bisherigen Gesichtspunkten wären elektronische Spektren von gewöhnlichen Farbstoffen beschränkt auf wenige, definierte Übergänge. In Realität sind die elektronischen Übergänge organischer Farbstoffmoleküle an Schwingungsübergänge gekoppelt. Zusätzlich ist jedes Schwingungsniveau mit Rotationsübergängen überlagert und Stöße, sowie elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Medium, führen zu zusätzlicher Linienverbreiterung. Das Resultat ist ein Quasikontinuum an Zuständen, das zu breiten Absorptions- und Fluoreszenzspektren führt. Bei Raumtemperatur ist nahezu nur das niedrigste Schwingungsniveau ($v = 0$) des elektronischen Grundzustands S_0 besetzt. Optische Übergänge erfolgen nach dem Franck-Condon-Prinzip instantan und werden als vertikale Linien im Energiediagramm dargestellt. Dabei können sowohl der Schwingungsgrundzustand als auch höhere Schwingungszustände des ersten angeregten Singulett-Zustands erreicht werden. Nach Born-Oppenheimer ist die Bewegung der Kerne im Vergleich zu denen der Elektronen um Größenordnungen langsamer und kann bei der Betrachtung elektronischer Übergänge vernachlässigt werden. Somit können die elektronischen Wellenfunktionen mathematisch getrennt von den Schwingungswellenfunktionen betrachtet werden ^[22]. Die Übergangswahrscheinlichkeit ist proportional zum Überlappintegral der Schwingungswellenfunktionen und die Spektren werden durch diese Franck-Condon-Faktoren moduliert. Höhere elektronische Zustände kehren sehr schnell durch strahlungslose Relaxation, sogenannte Innere Konversion (engl. *internal conversion*, IC), in den niedrigsten Schwingungszustand des ersten angeregten Zustands ($S_1, v=0$) zurück. Emission erfolgt aus diesem Zustand nach dem Frank-Condon-Prinzip in die jeweiligen Schwingungszustände des Grundzustands und führt zur Spiegelbildsymmetrie von Absorption und Emission. Die bathochrome Stokes-Verschiebung des Maximums im Emissionsspektrum lässt sich durch energetische Relaxation, verursacht durch eine Umorientierung der Umgebungsmoleküle, erklären ^[22,28].

Zusammenfassend werden Auftreten und Stärke eines optisch induzierten, elektronischen Übergangs durch drei Faktoren bestimmt: **1)** Den elektronischen Anteil, abhängig von der räumlichen Überlappung und den Symmetrien der Wellenfunktionen. **2)** Die Franck-Condon-Faktoren, die sich aus der Überlappung der Schwingungswellenfunktionen der Kerne und deren Symmetrien ergeben. **3)** Durch die orthonormalen Spinwellenfunktionen, die Übergänge nur zwischen Systeme gleicher Multiplizität erlauben ^[23]. Sind alle Bedingungen erfüllt werden im UV-Vis Bereich elektronische Spektren erhalten, deren Form dem Schema aus Abbildung 2 folgt.

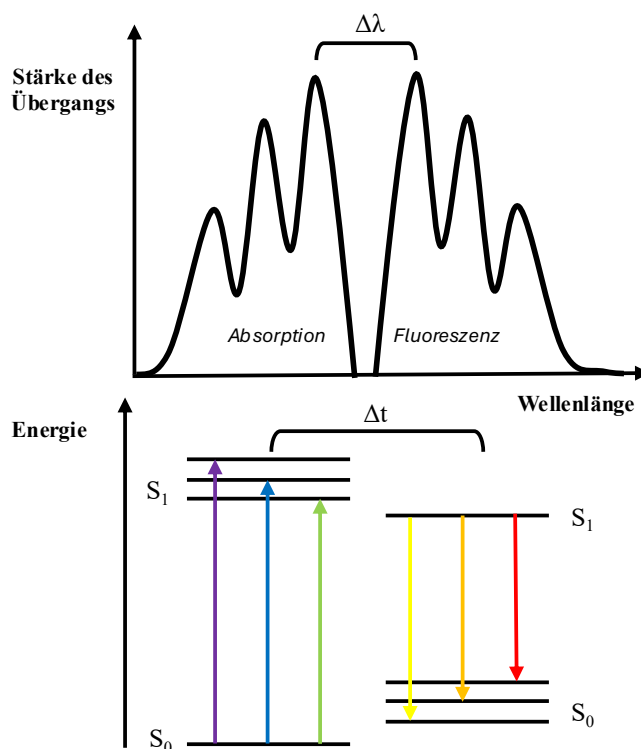


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Absorptions- und Emissionsspektrums eines organischen Chromophors und zugrundeliegendes Energieschema im Zwei-Niveau-System.

2.2 Detektion von Einzelmolekülen

Die Beobachtung von Reaktionen in der Einzelmolekülchemie bietet die einzigartige Möglichkeit neue Einsichten in Prozesse auf molekularer Ebene zu gewinnen. Hierzu ist es nötig, die Absorption oder Fluoreszenz eines einzigen Emitters gegenüber Milliarden anderer Moleküle und potentiellen Verunreinigungen auf einer Oberfläche, in Lösung oder in einem Feststoff, abzugrenzen. Zusätzliches instrumentelles Rauschen des Messaufbaus und Hintergrundsignale durch das Anregungslicht erschweren die Detektion. Um das Signal in analysierbarer Stärke aufzunehmen, sollten die Verringerung der Konzentration des Analyten, die Verwendung besonders reiner Ausgangsstoffe und Matrizen sowie ein ausreichendes SNR durch experimentelle Parameter sichergestellt werden. Im Extremfall wird in einem bestimmten Beobachtungsvolumen nur ein einzelnes Molekül in einem ausreichend großen zeitlichen Beobachtungsfenster untersucht^[25]. Dies können unter anderem konfokale Methoden leisten, für die in dieser Arbeit auf weiterführende Literatur hingewiesen wird^[29–32]. Zugute kommt der Einzelmolekülspektroskopie die Rotverschiebung der Fluoreszenz, wodurch das Anregungslicht mit Farbfiltern mit scharfen Absorptionskanten (6-10 Einheiten Optische Dichte) effektiv abgetrennt werden kann^[33]. Durch den Einsatz geeigneter Methoden lassen sich an Fluoreszenzfarbstoffen somit Reaktionsmechanismen aufklären, indem alternative Reaktionswege, kurzlebige Intermediate oder Heterogenitäten identifiziert werden.

Rybina et al. konnten die irreversible Umwandlung von Doppelbindungen eines chromophoren Systems auf Einzelmolekülniveau durch Immobilisierung auf einer Glasoberfläche abbilden und dabei alternative Reaktionspfade identifizieren ^[34]. Menges et al. fanden an einem ähnlichen Aufbau einen nicht-fluoreszierenden Dunkelzustand als Intermediat ^[35]. Weitere Studien befassten sich mit durch Nanopartikel katalysierten Umsetzungen von AmplexRed und konnten in Folge ein oberflächen-adsorbiertes Radikal als Zwischenzustand vermuten ^[36]. Auch am System Terrylen in *p*-Terphenyl konnten Zwischenzustände in konfokalen Einzelmolekülexperimenten identifiziert werden ^[37]. Durch Kombination von ¹H-NMR mit Einzelmolekülspektroskopie wurden von Easter et al. unerwartete Heterogenitäten bei der Polymerisation von Norbornen entdeckt ^[38]. Ansprüche an den verwendeten Farbstoff sind ein großer Absorptionsquerschnitt, hohe Photostabilität, geringe Übergangswahrscheinlichkeiten in Dunkelzustände und, im Falle der Fluoreszenzdetektion, eine hohe Quantenausbeute sowie der Ausschluss von fluoreszierenden Verunreinigungen ^[25]. Durch eine Optimierung dieser Parameter sollte die Fluoreszenzrate maximiert werden, um ein Molekül effektiv vom Untergrundsignal abzubilden. Neben dem Absorptionsquerschnitt ist vor allem die Quantenausbeute ein Maß für die Eignung des fluoreszierenden Moleküls. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit für die Emission eines Photons in Folge eines Absorptionsprozesses an und berechnet sich aus dem Verhältnis der Ratenkonstante für strahlende (k_r) und nichtstrahlende (k_{nrad}) Prozesse. τ_{Fl} stellt die (gemessene) Fluoreszenzlebensdauer dar, während τ_{rad} als natürliche Lebensdauer dem Kehrwert der Fluoreszenzrate entspricht ^[39].

$$\Phi_{Fl} = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nrad}} = \frac{\tau_{Fl}}{\tau_{rad}} \quad (5)$$

Die strahlende Ratenkonstante k_{rad} entspricht dem Einsteinfaktor A_{21} für spontane Emission. Zwischen spontaner Emission und Absorption sowie stimulierter Emission lässt sich mit den Einsteinfaktoren B_{12} und B_{21} der Zusammenhang aus Gleichung (6) herstellen ^[40]. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht der beschriebenen Prozesse im Zwei-Niveau-System.

$$\frac{1}{\tau_{rad}} = k_{rad} = A_{21} = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} B_{12} \quad (6)$$

mit $B_{12} = B_{21}$

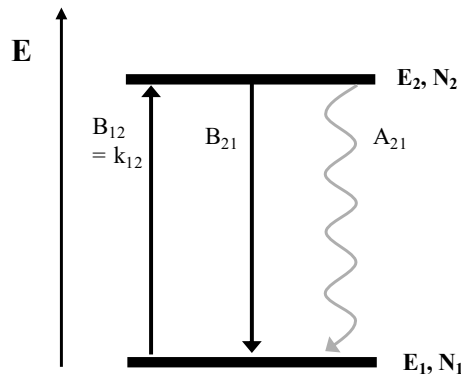


Abbildung 3: Einstein-Koeffizienten im Zwei-Niveau-System.

Aus Gleichung (6) ist die ν^3 -Abhängigkeit der Fluoreszenz erkennbar. Demnach nimmt die Wahrscheinlichkeit für spontane Emission mit sinkendem Abstand von elektronischem Grundzustand und erstem angeregten Zustand ab. Typische Werte für τ_{Fl} liegen im Bereich von Nanosekunden und die maximale Emissionsrate liegt im Bereich von 10^7 bis 10^9 Photonen pro Sekunde ^[22,23]. Somit sind mit einem dunkel-adaptierten Auge sogar einzelne Moleküle erkennbar ^[25]. Um einzelne Fluorophore erfolgreich detektieren zu können, müssen auch unerwünschte Signalquellen minimiert werden. Diese lassen sich mit Untergrundfluoreszenz, elektronischem Rauschen und Dunkelstrom des Detektors zusammenfassen. Vor allem bei Raumtemperatur spielen diese Faktoren eine große Rolle.

Das Einzelmolekülexperiment bedarf einer sorgfältigen Auswahl von experimentellen Rahmenbedingungen, um das gewünschte Signal zu maximieren und Verluste auf dem Weg zum Detektor zu minimieren. Ausschlaggebend ist das SNR, welches durch Gleichung (7) beschrieben werden kann ^[41]:

$$SNR = \frac{D \Phi_{Fl} \frac{\sigma_P}{A} \frac{P_0}{h\nu} t}{\sqrt{\frac{D\Phi_F\sigma_PP_0}{Ah\nu} + C_bP_0t + N_d t}} \quad (7)$$

$$D = \eta_Q F_{coll} F_{opt} \quad (8)$$

Die Gleichung beinhaltet die Höhe des Signals im Zähler mit den Größen Detektionseffizienz D , ausgedrückt als Anzahl der detektierten Photonen, Fluoreszenzquantenausbeute Φ_{Fl} , Absorptionsquerschnitt σ , ausgeleuchteter Fläche A und der Laserleistung P_0 im Zeitintervall t . D beinhaltet die (wellenlängenabhängige) Quantenausbeute des Detektors, den Einsammelfaktor F_{coll} und den Transmissionsfaktor F_{opt} , der den Verlust durch optische Bauteile und Filter berücksichtigt. F_{coll} ist stark von der NA des Objektivs und der Abstrahlcharakteristik der Moleküle abhängig ^[25,42]. Der Nenner beinhaltet diese Größen ebenfalls, jedoch tragen sie hier durch die Quadratwurzel weniger stark bei. Zusätzlich zählen zum Rauschen Untergrundzählrate C_b und Dunkelzählrate des Detektors N_d . Insgesamt lässt sich ableiten, dass das SNR mit steigender Laserleistung ansteigt, jedoch ein Maximum durch das Sättigungsverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen erreicht, da nicht beliebig viele Photonen pro Zeiteinheit emittiert werden können. Das Signal des Untergrunds wird von mehreren Quellen beeinflusst. Dazu zählen Fluoreszenzsignale von optischen Bauteilen und Verunreinigungen in Probe oder Matrix. Raman-Streuung der Anregungsquelle und der Matrix trägt ebenfalls zum Untergrund bei. Die Untergrundstrahlung nimmt mit der Energie der Anregungsstrahlung zu und tritt somit verstärkt im UV-Bereich auf ^[25].

Um das SNR zu maximieren, sollten möglichst viele Photonen des fluoreszierenden Analyten aufgesammelt werden. Die abgegebene Strahlung eines Moleküls kann als isotropisch in alle Raumrichtungen, also kugelförmig, angenommen werden. Der vom Objektiv eingesammelte Anteil der Strahlung beschreibt die Einsammeleffizienz EE . Sie kann aus dem Verhältnis von detektiertem Kugelsegment und gesamter Kugeloberfläche mittels folgender Zusammenhänge berechnet werden:

$$A_{Kugel} = 4\pi r^2 \quad (9)$$

$$A_{Obj} = 2\pi r^2 (1 - \cos(\alpha_{max})) \quad (10)$$

$$EE = \frac{A_{Obj}}{A_{Kugel}} = \frac{1}{2} (1 - \cos(\alpha_{max})) \quad (11)$$

2.3 Mikroskopiemethoden zur Abbildung von Einzelmolekülen

Ein häufig genutztes Werkzeug zur Beobachtung molekularer Prozesse stellen moderne Lichtmikroskope zur Detektion von Einzelmolekülfluoreszenz dar, die die zuvor genannten Kriterien erfüllen können. Zur Detektion einzelner Moleküle existieren verschiedene Techniken, die sich grob in scannende Methoden (optische Nahfeldmikroskopie, engl. *near-field scanning optical microscopy* NSOM^[43] sowie konfokale Mikroskopie^[31]) und Weitfeldmethoden (Epifluoreszenz-^[44] und Totalreflektionsmikroskopie^[45]) einteilen lassen.

Mittels einem Laser oder auch LED-Lampen wird in der Weitfeldmikroskopie eine Fläche von mehreren Mikrometern beleuchtet, das Detektionslicht mittels Filter optisch vom Anregungslicht getrennt und die Fluoreszenz auf einen zweidimensionalen Flächendetektor mit (EM)CCD-Sensoren, oder neuerdings auch sCMOS-Sensoren^[46], geleitet. Diese digitalen Kameras konvertieren das Licht einzelner Moleküle in elektrische Signale und zeichnen sich durch hohe Quanteneffizienz (>80%), niedriges Ausleserauschen und Aufnahmegeschwindigkeiten im Millisekundenbereich aus^[47]. Vorteil dieser Methoden ist es, Position und Signal mehrerer Emittoren im Beobachtungsfeld in Echtzeit und simultan beobachten zu können. Nachteil ist die, im Vergleich zu den Punktdetektoren von konfokalen Methoden, schlechtere zeitliche Auflösung, die durch die maximale Akquisitionsrate des Flächendetektors limitiert ist^[25]. Im Falle von EMCCD-Kameras können schwache Signale, die unter der Amplitude des Ausleserausches liegen, durch Elektronenvervielfachung verstärkt werden. Zu beachten ist, dass dabei auch eine zusätzliche Rauschkomponente eingeführt wird. Für Signalquellen mit hoher Lichtstärke kann das SNR dadurch nachteilig beeinflusst werden^[45]. Durch Kombination mit dispergierenden optischen Bauteilen vor dem Detektor lassen sich auch spektrale Informationen einzelner Moleküle gewinnen, wobei einzelne Pixel als Detektoren für bestimmte Wellenlängen fungieren und nach Kalibrierung zur Aufnahme von Einzelmolekülspektren dienen können^[48,49].

Bei den hier vorgestellten Systemen ist die Beobachtung von einzelnen Molekülen nur bis zu einer bestimmten Auflösungsgrenze möglich. Die Wellenlänge der emittierten Strahlung liegt um ein bis zwei Größenordnungen über der tatsächlichen Größe der Farbstoffmoleküle von wenigen Nanometern, weshalb sie im Lichtmikroskop als beugungslimitierte Punkte nur mit einer bestimmten minimalen lateralen Ausdehnung detektiert werden können.

Nach Abbe^[50] wird die Auflösung des optischen Mikroskops, also der minimale Abstand d zweier Objekte die voneinander getrennt abgebildet werden können, durch die Wellenlänge der Anregungsquelle, den Brechungsindex n des Mediums und den halben Öffnungswinkel α des Objektivs bestimmt. Das Produkt aus Winkel und Brechungsindex wird numerische Apertur (NA) genannt und bestimmt maßgeblich die Güte des verwendeten Objektivs.

$$d = \frac{\lambda}{n * \sin\alpha} = \frac{\lambda}{NA} \quad (12)$$

Bei Verwendung eines Kondensors, wodurch die Probe mit einem Lichtkegel beleuchtet wird, ergibt sich d durch:

$$d = \frac{\lambda}{2 * NA} \quad (13)$$

Mit der Verwendung wissenschaftlicher Objektive mit hoher NA lassen sich einzelne Moleküle als Lichtpunkte im Bereich von wenigen hundert Nanometern auf den Sensor abbilden. Durch Beugung des Lichts an Linsen und Optiken des Mikroskops und anschließende Fokussierung, tritt ein Lichtpunkt jedoch nicht klar definiert, sondern als radialsymmetrisches Beugungsscheibchen nach Airy^[51], auch Punktspreizfunktion (PSF) genannt, auf. Diese kann durch eine Gauß-Funktion angenähert werden und ihre Halbwertsbreite ω (engl. *full width at half length*, FWHM) ist ebenfalls von NA und Wellenlänge der Fluoreszenz^[30,52] abhängig. Sie kann durch Gleichung (14) berechnet werden und kommt der Auflösung von Abbe aus Gleichung (13) sehr nahe:

$$\omega (FWHM) = 0.51 \frac{\lambda_{Fl}}{NA} \quad (14)$$

Der Radius des zentralen Lichtpunkts wird bestimmt durch:

$$r_{Airy} = 0.61 \frac{\lambda_{Fl}}{NA} \quad (15)$$

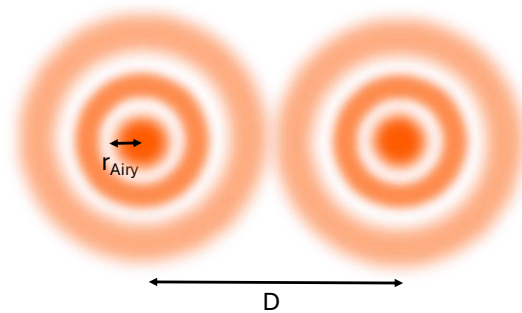


Abbildung 4: Darstellung zweier Airy-Beugungsscheibchen mit radialsymmetrischer Intensitätsverteilung im Abstand D .

Nach dem Rayleigh-Kriterium^[53] sind zwei Punkte nun voneinander unterscheidbar und somit aufgelöst, wenn ihr Abstand höchstens dem Radius des Beugungsscheibchens entspricht (Abbildung 4). Ist der Abstand D größer als r , sind die Signale unterscheidbar. Ist der Abstand niedriger, überlappen die Signale so weit, dass sie nicht mehr aufgelöst werden können.

Die Genauigkeit der Abbildung im Weitfeld wird zusätzlich durch die Pixelgröße des Sensors und die Vergrößerung des Mikroskops bestimmt^[25]. Obwohl die hier diskutierten Überlegungen zum Auflösungsvermögen von Lichtmikroskopen unterschiedliche Ansätze verfolgen, liegen die Werte für r_{Airy} , FWHM und d in einem ähnlichen Bereich. Als einfache, experimentell bestimmbare Größe hat sich die FWHM zur Charakterisierung der Auflösung etabliert^[54]. Typische Mikroskopiebilder von einzelnen Molekülen sind beispielhaft in Abbildung 5 dargestellt.

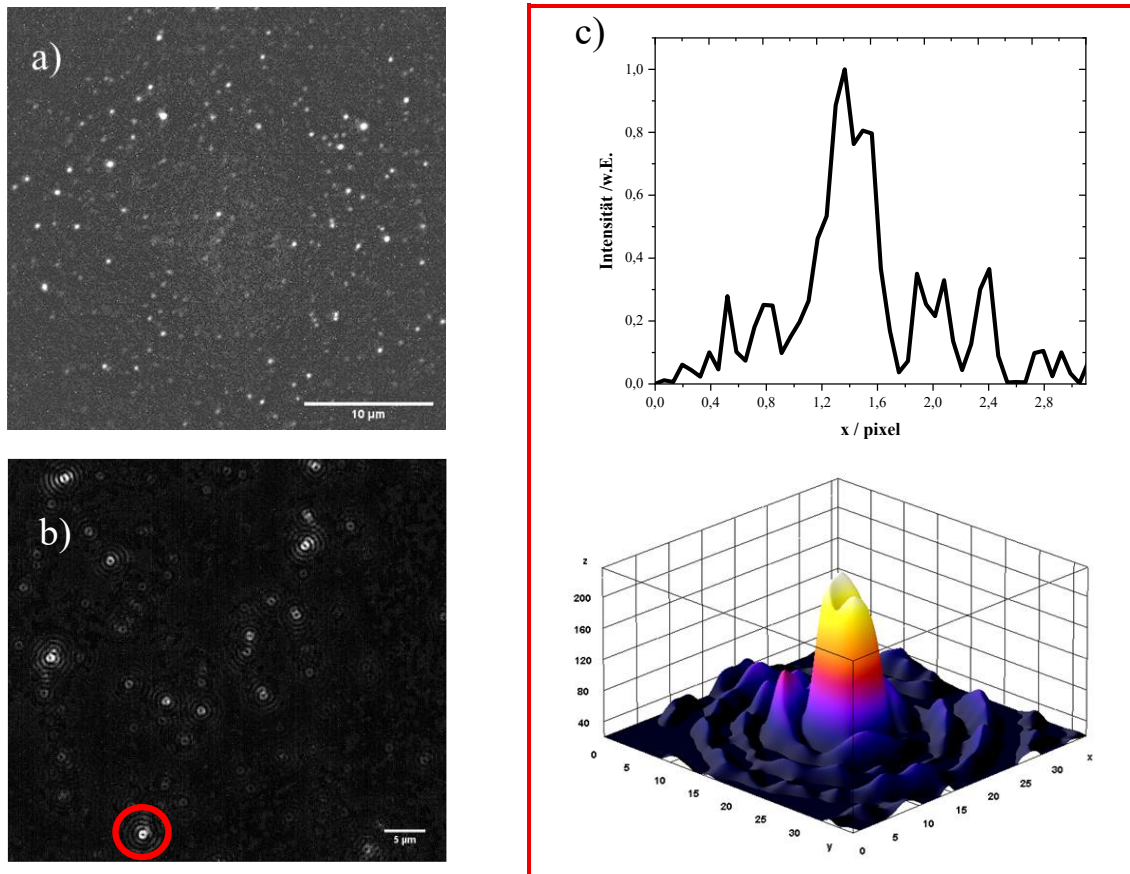


Abbildung 5: a) Immobilisierte HPDE-APTES Moleküle erscheinen als Lichtpunkte auf dem Detektionschip einer sCMOS Kamera. b) Einzelne Terrylen-Moleküle in einer *p*-Terphenyl Matrix zeigen deutliche Beugungsmuster. c) 2D- und 3D Ansicht der Beugungsmuster aus b).

Die Photonen einzelner Lichtpunkte verteilen sich im Fall von Flächendetektoren auf mehrere Pixel des Sensors. Das Signal wird von der Kamera digitalisiert und in einer Zählrate mit willkürlicher Einheit, als Grauwert ausgegeben. Basis des Signals von sCMOS und CCD-Kameras sind ein konstanter Offset, bedingt durch Geräteparameter, sowie die bereits erwähnte Dunkelzählrate und der Untergrund^[55]. Wird ein solches Signal gegen die Zeit aufgetragen, ergeben sich Zeitspuren wie in Abbildung 6 dargestellt^[56]. Solche Zeitspuren auf der Millisekunden- bis Sekundenskala sind durch das An/Aus-Verhalten von Molekülen geprägt. Die Emission eines einzelnen Moleküls folgt einem digitalen Verhalten und kann trotz kontinuierlicher Anregung zwischenzeitlich pausieren, bevor sie am Ende des Beobachtungsfensters in einen irreversiblen Dunkelzustand wechselt. Reversible Dunkelphasen werden als „Blinken“ bezeichnet.

Dieses Verhalten ist charakteristisch für einzelne Moleküle [57,58] und die Analyse der Fluktuation sowie deren Dauer kann zur Analyse der zugrundeliegenden photophysikalischen Prozesse genutzt werden [59]. Beispiele für solche Prozesse sind Übergänge in Triplettzustände [60], Bildung von Radikalanionen [61] oder -kationen [62], Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) [63], chemische Umsetzungen [35,62,64] und Dynamiken von Biomolekülen [65–67]. Blinken kann durch Manipulation der chemischen Umgebung, beispielsweise durch Zugabe von Elektronendonoren oder –akzeptoren oder Verbindungen, die zur Löschung des Triplettzustandes beitragen, reduziert werden [33]. Direkte Anwendung fand das Blinken und optische Schalten von Molekülen (und Proteinen im Speziellen) in der Entwicklung der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie [10,68,69].

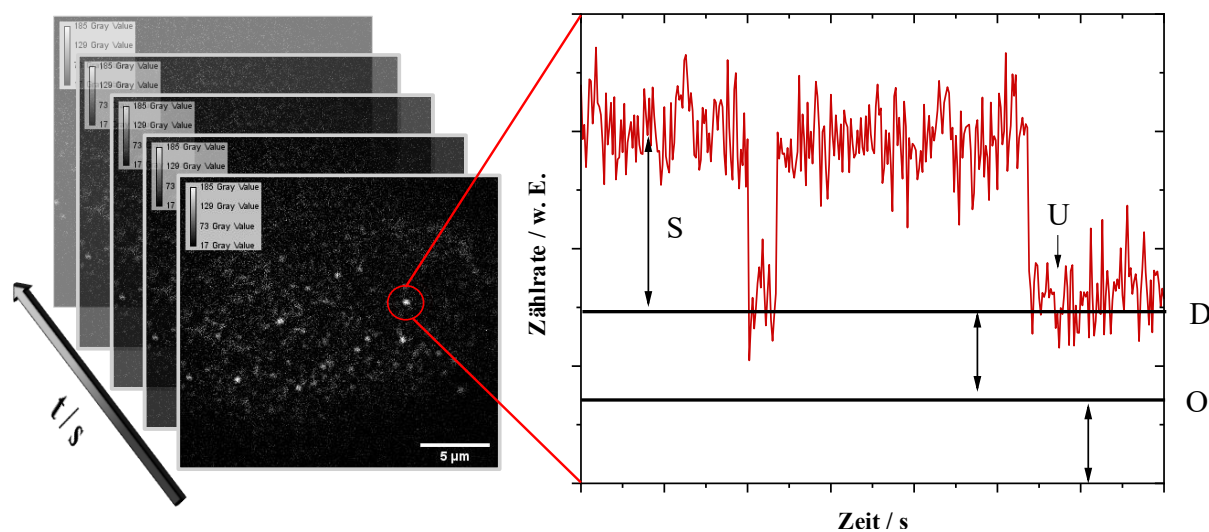


Abbildung 6: Zusammensetzung einer typischen Einzelmolekülzeitspur mit Signal S, Untergrundzählrate U, Dunkelzählrate D und Off-Set O des Detektors. Das gezeigte Molekül wechselt kurzzeitig in einen reversiblen Dunkelzustand bevor irreversibles Photobleichen auftritt.

Nach Aufnahme der Daten sollten diese vor der Analyse zunächst einen Workflow zur Aufbereitung durchlaufen [70]. Das Entfernen von störenden Untergrundsignalen ist mittels Rolling-Ball Algorithmus möglich [71]. Ebenso kann eine Driftkorrektur nötig sein. Durch Korrektur von Geräteparametern wie Dunkelzählrate, Offset und Quanteneffizienz der Detektorkamera, können die Grauwerte in detektierte Photonen umgerechnet werden. Einzelmolekülereignisse, wie in obiger Abbildung dargestellt, können im Anschluss identifiziert und sortiert werden. Neben einer manuellen Extraktion der Spuren sind heutzutage auch automatische Methoden verfügbar, die Einzelmolekülspuren erkennen, extrahieren und korrelieren können. Bei Aufspaltung des Fluoreszenzsignals in verschiedene Kanäle ergibt sich die Möglichkeit, Moleküle unterschiedlichen Zuständen zuzuordnen, um zum Beispiel FRET zu analysieren [64,72].

Auch fortgeschrittene, statistische Analysen können für Zuordnungen von Einzelmolekülsignalen in Betracht gezogen werden. Vor allem multivariate Verfahren wie die Clusteranalyse werden allgemein dazu verwendet, Variablen oder Fälle einer Stichprobe zu Clustern zusammenzufassen. Die Methoden vereint, dass zunächst eine Transformation der Daten erfolgt.

Dazu wird ein Distanz- oder Ähnlichkeitsmaß mittels eines Algorithmus gebildet und anschließend Cluster anhand eines Agglomerierungsverfahrens gebildet. Als Transformationsmaß wird im einfachsten Fall die euklidische Distanz nach Gleichung (16) verwendet, um die Ähnlichkeit zweier Fälle oder Variablen zu quantifizieren ^[73].

$$d(x, y) = \sqrt{\sum (x_i - y_i)^2} \quad (16)$$

Die K-Means Clusteranalyse eignet sich dazu, Beobachtungen durch eine Anzahl von K Clustern zu klassifizieren. Sie sollte für größere Stichproben ab einem Umfang von 100 verwendet werden und setzt einen der einfachsten Algorithmen zum Lösen von Clusterproblemen ein. Dabei werden Beobachtungen nacheinander dem nächstgelegenen Cluster-Zentrum zugeordnet und die Distanz zum Zentrum wird aus der euklidischen Distanz berechnet. Die anfänglichen Cluster-Zentren können vorgegeben werden und werden anschließend durch die Bildung des Mittelwerts der zugeordneten Beobachtungen aktualisiert ^[73–75]. Idealerweise ist die Anzahl der Cluster vorher bekannt oder die optimale Anzahl wird durch ein iteratives Verfahren bestimmt ^[74]. Die K-Means Clusteranalyse und verwandte Verfahren wurden bereits in der Analyse und Zuordnung von Einzelmolekülsignalen, unter anderem in Methoden der hochauflösenden Mikroskopie, verwendet ^[76–79].

Einfach zugängliche und charakteristische Größen der weiter oben genannten photophysikalischen Prozesse sind die Ratenkonstanten der jeweiligen Übergänge. Bei Betrachtung eines einzelnen Ausgangsmoleküls ist die Zeit bis zum Auftreten eines Einzelmolekülereignisses, das zu einem Intensitätsabfall führt, zufällig und daher nicht vorhersagbar. Stattdessen kann die Wahrscheinlichkeit des Prozesses berechnet werden, indem das Verhalten einer größeren Anzahl von Molekülen gemittelt wird. Dies erfolgt durch die Darstellung der charakteristischen Zeiten in einem Histogramm. Im Falle einfacher, monomolekularer Umsetzungen nach dem Schema $A \rightarrow B$ kann die Ratenkonstante des Prozesses durch eine monoexponentielle Anpassung dieser Kurven bestimmt werden. Eine Abschätzung der Ratenkonstante kann auch durch den Mittelwert der beobachteten Zeiten getroffen werden ^[57,80].

2.4 Interne Totalreflektionsmikroskopie und ihre Anwendung zur Einzelmoleküldetektion

Vor allem an der Grenzfläche fest/flüssig und fest/gasförmig hat sich die Mikroskopie auf Basis der internen Totalreflektion (engl. *total internal reflection*, TIRF) für die Detektion molekularer und zellulärer Prozesse bewährt gemacht. Zunächst wurde die selektive Ausleuchtung von fest/flüssigen Grenzflächen 1965 ^[81] berichtet und schließlich von Daniel Axelrod als Mikroskopiemethode (TIRFM) beschrieben, um selektiv fluoreszierende Moleküle an der Kontaktfläche eines Zellsubstrats abzubilden ^[82]. In den folgenden Jahrzehnten wurde die Technik mit weiteren Fluoreszenzmethoden kombiniert und weiterentwickelt um Adsorptionsprozesse, Gleichgewichtskonstanten, Oberflächendiffusion und Zellprozesse ^[83], sowie diverse Anwendungen für Einzelmoleküle ^[70,84–86] im Speziellen, zu entwickeln. Die TIRFM beruht auf der Erzeugung eines evaneszenten Anregungsfeldes, das dafür genutzt wird, Moleküle nahe der jeweiligen Grenzfläche anzuregen. Durch das besondere Anregungsprofil tritt das Anregungslicht, abhängig von der Wellenlänge, nur wenige hundert Nanometer in das optisch dünnere Medium ein. Dadurch können Hintergrundfluoreszenz und Raman-Streuung aus außerfokalen Bereichen effektiv eliminiert und das SNR im Vergleich zum Epifluoreszenzmikroskop verbessert werden ^[87].

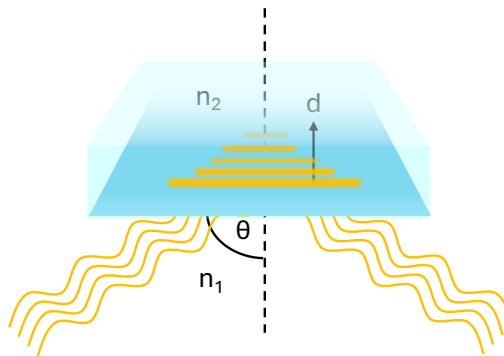


Abbildung 7: Darstellung der internen Totalreflektion zwischen zwei Medien.

Die Erzeugung des evaneszenten Feldes, wie in Abbildung 7 dargestellt, beruht auf den Gesetzen zur Lichtbrechung an Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices. Nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz sind Einfallswinkel θ_1 und Winkel des gebrochenen Strahls θ_2 von den Brechungsindices n_1 und n_2 abhängig:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (17)$$

Interne Totalreflektion tritt auf, wenn das Anregungslicht aus einem optisch dichteren Medium n_1 , z.B. Glas, mit einem Einfallswinkel größer als der kritische Winkel θ_c auf ein optisch dünneres Medium n_2 , z.B. Wasser, Cytoplasma oder Luft, trifft ^[87].

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1} \quad (18)$$

Obwohl der einfallende Strahl reflektiert wird, dringt eine elektromagnetische Welle als evaneszentes Feld in das optisch dünnere Medium ein und breitet sich parallel zur Oberfläche aus.

Die Intensität senkrecht dazu nimmt exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche z ab und wird durch die Eindringtiefe d charakterisiert ^[82]:

$$I = I_0 \exp\left(\frac{-z}{d}\right) \quad (19)$$

$$d = \frac{\lambda}{4\pi n_2} \left(\frac{\sin^2 \theta}{\sin^2 \theta_c} - 1 \right)^{-1/2} \quad (20)$$

d nimmt mit steigendem Einfallswinkel ab und die Intensität I_0 der evaneszenten Welle liegt für $z = 0$ in der Größenordnung des Anregungslichts ^[82]. I_0 besitzt unterschiedliche Abhängigkeiten vom Einfallswinkel für parallel und senkrecht polarisiertes Anregungslicht und sinkt mit steigendem Einfallswinkel. Wird TIRFM nahe am kritischen Winkel durchgeführt, kann die Intensität des Anregungslichts sogar übertroffen werden ^[83]. Für die meisten experimentellen Aufbauten kann ein Molekül nahe oder auf der Grenzfläche somit mit der gleichen Effizienz angeregt werden, als befände es sich im Anregungsstrahlengang. Diese Effizienz nimmt unter Beachtung der Gleichungen (19) und (20) ebenfalls exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche ab. Beispielsweise beträgt die relative Fluoreszenzintensität mit 100 nm Abstand von der Grenzfläche nur noch 43% ^[82]. Die Nähe zur Grenzfläche hat auch einen maßgeblichen Einfluss auf die Abstrahlcharakteristik der detektierten Moleküle und es ergeben sich charakteristische Unterschiede, wenn der relative Brechungsindex zwischen den beiden dielektrischen Medien mehr als $\sqrt{2}$ beträgt ^[88]. Für Dipole in unmittelbarer Nähe zur Grenzfläche wird ein großer Teil der Strahlung in das optisch dichtere Medium abgegeben. Steht ein Molekül senkrecht zur Grenzfläche, berechnet sich die Leistung im Medium mit dem kleineren Brechungsindex (n_1) sowie im Medium mit dem größeren Brechungsindex (n_2) durch folgende Zusammenhänge ^[88]:

$$P(\theta_1) = \frac{3}{8\pi} * \frac{\left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2 * \sin^2 2\theta_1}{\left(\frac{n_2}{n_1} \cos(\theta_1) - \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_1)}\right)^2} \quad (21)$$

$$P(\theta_2 \geq \theta_{krit}) = \frac{3}{8\pi} * \frac{\left(\frac{n_2}{n_1}\right)^5 * \sin^2 2\theta_2}{\left(\frac{n_2}{n_1} - 1\right)^2 \left(\left(\frac{n_2}{n_1} + 1\right) (\sin^2 \theta_2 - 1)\right)} \quad (22)$$

TIRF-Mikroskopie wird üblicherweise mit einer von zwei Anregungsgeometrien durchgeführt, die in Abbildung 8 schematisch für ein invertiertes Mikroskop dargestellt sind. Wird ein Prisma für die Einkopplung und Ablenkung des Anregungslasers mit dem korrekten Winkel auf die Oberfläche verwendet, spricht man von prismenbasiertem TIRF (p-TIRF). Beim objektivbasierten TIRF (o-TIRF) wird der Laserstrahl durch das Objektiv gelenkt und trifft den Probenträger von der zugewandten Seite. Experimentell wird dies realisiert, indem im Anregungsstrahlengang eine zusätzliche Linse platziert wird. Diese fokussiert den Laserstrahl in der hinteren Fokalebene des Objektivs und lässt durch Veränderung ihrer Position das Anregungslicht im Randbereich der Frontlinse austreten.

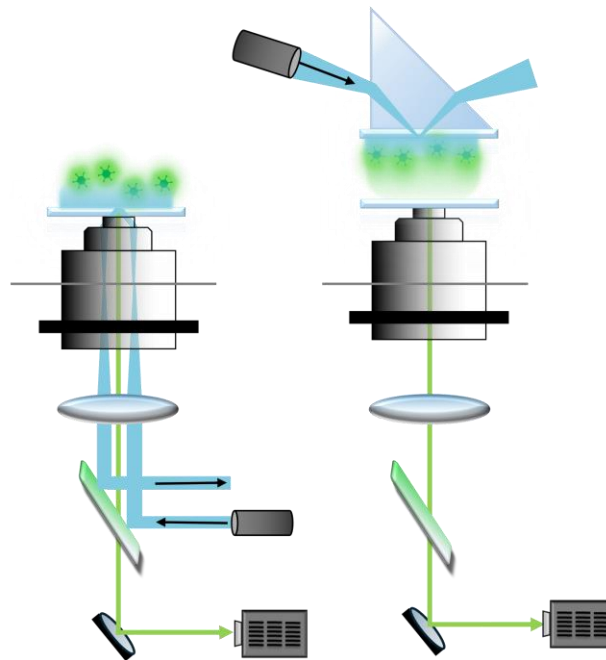


Abbildung 8: Schematischer Aufbau mit Strahlengang von o-TIRF (links) und p-TIRF (rechts). Anregungsstrahlengang blau, Detektionsstrahlengang grün.

Die Ausleuchtung der Probe kann durch die Brennweite der Linse und zusätzliche Strahlaufweitung beeinflusst werden ^[45]. Hierdurch kann der Austrittswinkel eines nun parallelen Strahlengangs justiert werden, bis Totalreflektion erreicht wird. Entscheidender Parameter bei dieser Methode ist die NA des verwendeten Objektivs. Sie bestimmt den maximalen Austrittswinkel der Strahlen und muss groß genug sein, um Winkel oberhalb von θ_c erreichen zu können ^[45]. Von Vorteil sind Objektive mit höherer NA, da störendes Streulicht und Inhomogenitäten bei einem Betrieb nahe am maximalen Austrittswinkel verstärkt auftreten ^[89]. Da sowohl Anregungs- als auch Detektionsstrahlengang durch das Objektiv führen, ist mit zusätzlichen Interferenzen durch Oberflächen und optische Bauteile in Form von Streulicht und Reflektionen zu rechnen. Hierdurch kann das SNR negativ beeinflusst werden ^[87,90–92]. Der Aufbau des Anregungsstrahlengangs im p-TIRF ist im Vergleich dazu leichter zu realisieren und führt allgemein zu einer homogenen Intensitätsverteilung, höherem Kontrast und höherem SNR ^[45,93,94]. Zudem ist die Einkopplung von Mehrfarbenanregung in Bezug auf optische Bauteile, wie den dichroitischen Spiegel, einfacher ^[90]. Nachteil ist die komplexere Handhabung und Probenvorbereitung, da das Prisma zwischen jedem Probenwechsel angehoben und neu ausgerichtet werden muss. Weiterhin wird der obere Zugang zur Probe blockiert und erschwert die Zugabe von Lösung, Reagenzien oder Pufferlösung ^[45]. Zusätzlich muss das Fluoreszenzlicht durch das optisch dünnere Medium wandern und wird vom Objektiv von der gegenüberliegenden Seite aufgesammelt. Durch die Abstrahlcharakteristik an der Grenzfläche und weitere Entfernung der Probe vom Objektiv ist für p-TIRF daher mit einer geringeren Einsammeleffizienz und damit weniger detektierten Photonen zu rechnen ^[93]. Je nach Anforderungen des Experiments müssen die Vor- und Nachteile der beiden Methoden sorgfältig abgewogen werden. Für die Detektion im TIRF-Mikroskop wird die ausgeleuchtete Fläche mittels der oben genannten (EM)CCD oder sCMOS Kameras abgebildet.

2.5 Reaktionsverfolgung an Einzelmolekülen mit TIRFM

Methoden zur Untersuchung von chemischen Reaktionen finden in den meisten Fällen auf der Makroebene statt, wobei exponentieller Zerfall der Edukte und Zunahme der Produkte über die Zeit beobachtet werden. Dabei werden selbst in mikromolaren Lösungen in jedem Tropfen Moleküle in der Größenordnung von Trillionen umgesetzt ^[57]. Die Fluoreszenz hat sich dabei in den Naturwissenschaften, vor allem in der Biologie, dank hoher Empfindlichkeit, räumlicher und zeitlicher Auflösung sowie der Möglichkeit mehrere Signale gleichzeitig zu verfolgen, als eine der Methoden der Wahl etabliert. Sowohl durch Markierung von Biomolekülen mit Fluoreszenzmarkern aber auch direkte Beobachtung fluoreszierender Moleküle, lassen sich biologische Prozesse entschlüsseln, indem bindings- oder aktivitätsbasierte Ansätze verfolgt werden ^[95,96]. Zahlreiche Beispiele können in der Literatur für solche Anwendungen gefunden werden ^[97–101].

Die Verfolgung von Prozessen anhand von fluoreszenzspektroskopischen Signalen hat sich derweil auch als Instrument der klassischen Chemie weiterentwickelt und kann für Bildgebung, kinetische Analysen, Verfolgung nanokatalytischer Prozesse ^[102], Reaktionsverfolgung in mikrofluidischen Systemen ^[103] oder die direkte Reaktionsverfolgung in Reaktionsgefäßen via fluorometrischer Sonden ^[104] verwendet werden. Durch die Fortschritte in der Fluoreszenzmikroskopie haben sich, nach anfänglicher Konzentration auf biophysikalische Studien, inzwischen auch mechanistische Studien chemischer Reaktionen auf dem Einzelmolekülniveau etabliert ^[105]. Selbst einfache organische Reaktionen können hier unerwartete Mechanismen oder unterschiedliche Reaktionspfade aufzeigen, die nur von einem kleinen Prozentsatz der Moleküle einer Reaktionslösung verfolgt werden und in traditionellen analytischen Methoden im Ensemble unentdeckt bleiben ^[20]. Sogar in hochgeordneten, kristallinen Systemen können Heterogenitäten auftreten, die zeigen, dass das chemische Verhalten von Molekülen stark von ihrer lokalen Umgebung abhängig ist ^[25,37]. Durch die Einzelmolekülspektroskopie ist der Zugang zu Charakteristika individueller Moleküle, wie etwa die Anordnung und Besetzung von Energieniveaus, angeregten Zuständen und Schwingungsmoden möglich, die ein zu einem tiefergehenden Verständnis von intrinsischen physikalischen und chemischen Eigenschaften von Molekülen und Reaktionen führen ^[106].

Rapide Entwicklungen und Anforderungen an Abbildungsmethoden mit hohem SNR und hoher Auflösung haben auch die TIRFM auf diesem Gebiet vorangebracht ^[102]. Prominente Beispiele, bei denen Reaktionen auf dem Einzelmolekülniveau abgebildet werden konnten, sind die Untersuchung der photokatalytischen Aktivität von Anatas/TiO₂ mittels einer fluorogenen Sonde auf Basis eines Bodipy Farbstoffs ^[107] und ein Reporter System auf Basis von Perylendiimid (PDI), das über photoinduzierten Elektronentransfer (PET) die Bindung von Protonen oder Metallionen anzeigen kann ^[108]. Ebenfalls konnte mit TIRF die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch TiO₂-Nanopartikel auf dem Einzelmolekülniveau nachgewiesen werden, wobei Terrylendiimid (TDI) als fluoreszierende Sonde fungierte ^[109].

Weiterhin konnte die katalytische Reduktion von Resazurin durch Goldnanopartikel von Chen et al. abgebildet werden ^[110] und die Palladium-katalysierte Tsuji-Trost De-Allylierung am Beispiel einer aromatischen Photosäure analysiert werden ^[35], wobei jeweils neue Einblicke in die Kinetik der Reaktionen gewonnen werden konnten. Prinzipiell kann der fluoreszierende Farbstoff bei solchen Untersuchungen als inertes Reportermolekül fungieren, bei dem die Reaktion an einer funktionellen Gruppe im Molekülgerüst außerhalb des chromophoren Systems stattfindet. Für die Detektion muss hier auf andere Parameter als die Fluoreszenzfarbe zurückgegriffen werden ^[111]. Alternativ nimmt das chromophore System selbst an der Reaktion teil und wird chemisch verändert, einhergehend mit einer Änderung der Fluoreszenzfarbe und somit einfacher Unterscheidbarkeit der Reaktanden ^[105,112]. Folglich muss das chromophore System bei diesem Ansatz auf die Reaktion ausgerichtet sein ^[113,114]. Um eine Reaktion auf dem Einzelmolekülniveau zu realisieren und abbilden zu können, bedarf es einer sorgfältigen Auswahl an experimentellen Bedingungen, die im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden sollen.

Es existieren zwei grundlegende Strategien, um Reaktionen an solchen Farbstoffen zu untersuchen. Der Fluorophor kann zum einen frei in Lösung beobachtet werden ^[115], wobei Rotation und Diffusion durch das Anregungsvolumen sowie Adsorption und Desorption vom Objektträger auftreten können. Zum anderen kann der Farbstoff chemisch oder physikalisch an eine Oberfläche, im einfachsten Fall an den gläsernen Objektträger, gebunden werden. Damit wird ein längeres Beobachtungsfenster ermöglicht, das nicht durch Diffusion, sondern nur noch durch das Auftreten der gewünschten Reaktion sowie irreversibles Photobleichen beschränkt ist ^[116,117]. Zu beachten sind hier jedoch eventuelle Artefakte oder Beeinflussung durch die Nähe zur Oberfläche ^[118]. Zum Beispiel ist für senkrecht orientierte Emitter in direkter Nähe zu dielektrischen Oberflächen mit einer Reduktion der Fluoreszenzlebenszeit von Farbstoffen von bis zu 10% zu rechnen ^[119]. Viele Anwendungen der TIRFM beinhalten die Beobachtung diffundierender Farbstoffe, vor allem in biologischen Systemen ^[13,98,120,121]. Durch die Vergrößerung des Beobachtungsfensters und die Abbildung vollständiger Zeitspuren, ist die Immobilisierung für die Abbildung von Reaktionen üblicherweise vorzuziehen ^[117,122]. Zu erwähnen sind auch Methoden mit „pseudo-Immobilisierung“, die sich Gele, Vesikel oder nanoskalige Strukturen zunutze machen, um die Farbstoffe in ihrer Bewegung einzuschränken. Damit wird dennoch Diffusion ermöglicht und die Vorteile beider Methoden werden kombiniert ^[66,85,123,124].

Sowohl für chemische als auch physikalische Immobilisierung stehen unterschiedliche Methoden bereit. Eine einfache Möglichkeit der physikalischen Immobilisierung bietet die Einbettung in optisch transparente Polymerfilme, beispielsweise PVA ^[125], PE ^[41], PS ^[126] oder PMMA ^[127]. Hierzu können Farbstoff und Polymer in einem geeigneten Lösungsmittel vorgelegt und durch Spin-Coating auf den Objektträger aufgebracht werden ^[128]. Statt Matrizen aus Polymeren können auch kristalline Systeme aus meist polyzyklischen Aromaten verwendet werden. *p*-Terphenyl ^[8,129–131], Biphenyl ^[132–135], Naphtalin ^[133,136] oder *p*-Dichlorobenzol ^[15] können als Beispiele genannt werden.

Ein oft genutztes System ist auch die Shpolskii-Matrix, die aus n-Alkanen bei Temperaturen unter deren Gefrierpunkt besteht ^[137]. Obwohl die Gastmoleküle die Gitterspannung im Kristall erhöhen, können sie wohldefinierte Positionen und diskrete elektronische Zustände einnehmen ^[138]. Offensichtlicher Nachteil der Immobilisierung in Matrix ist die fehlende Möglichkeit Reagenzien von außen gezielt zuzugeben. Die vorgestellten Methoden eignen sich aber gut, um photophysikalische Parameter oder Reaktionen wie das Photobleichen zu untersuchen, da in den Matrizen gelöster oder vorhandener Sauerstoff die Farbstoffe durch Diffusion erreichen kann ^[128].

Zur chemischen Bindung des Farbstoffs an die Oberfläche haben sich einige ausgewählte Reaktionen etabliert. Für gläserne Objektträger bietet es sich an die oberflächlichen Hydroxylgruppen zu funktionalisieren ^[139]. Dazu sollten die Oberfläche z. B. durch oxidierende Säuren wie HNO₃ oder Peroxomonoschwefelsäure (Piranhasäure, H₂SO₄/H₂O₂) zunächst gereinigt und aktiviert werden ^[140,141]. Für die Bindung an die Glasoberfläche können Ankermoleküle wie 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) über funktionelle Gruppen wie Säurechloride ^[142,143], NHS-Ester ^[144–146] oder Azide für Click-Chemie ^[147] an den Farbstoff, und über Siloxan-Bindungen an die Oberfläche gebunden werden. Beispielhaft ist die Reaktionsfolge für eine chemische Immobilisierung in Abbildung 9 dargestellt.

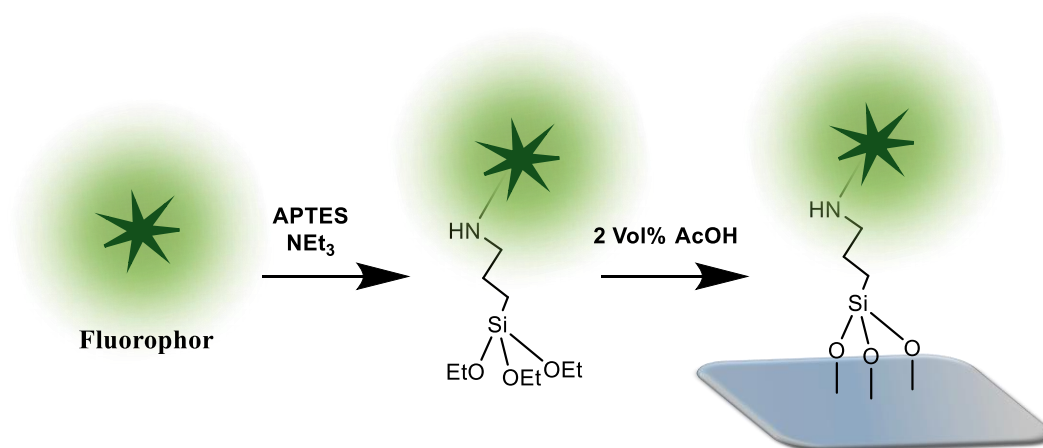


Abbildung 9: Chemische Immobilisierung eines Fluorophors auf einer Glasoberfläche mit APTES.

Ebenfalls bietet sich eine Passivierung an, um nichtspezifische Bindungen und reaktive Oberflächen zu verhindern, die Oberfläche möglichst gleichförmig zu gestalten und Fehlstellen auszugleichen, um falsche Signale zu verhindern ^[148]. Für die Passivierung eignen sich ebenfalls Silane, die unter geeigneten Bedingungen eine gleichmäßige Monolage bilden ^[149]. APTES selbst ist hierfür weniger gut geeignet, da es verschiedene Orientierungen auf der Oberfläche einnehmen kann und die Bildung einer Monolage schwer zu kontrollieren ist ^[150]. Vorteilhafter ist es, im ersten Schritt nur den Farbstoff an den Linker APTES zu binden. Für die Passivierung werden stattdessen hydrophobe Alkyl- ^[151,152] oder perfluorierte ^[153] Trialkoxy- oder Trichlorsilane ^[154] verwendet. Mit APTES funktionalisierter Farbstoff kann dann auf die Glasoberfläche aufgebracht werden, indem funktionalisierter Farbstoff zusammen mit passivem Silan immobilisiert wird. Alternativ kann die Oberfläche zunächst passiviert werden und freie Stellen in der Monolage im zweiten Schritt mit funktionalisiertem Farbstoff besetzt werden.

Diese freien Stellen können durch einen zusätzlichen Spülschritt generiert werden, wie in einer von Menges et al. entwickelten Methodik demonstriert ^[155].

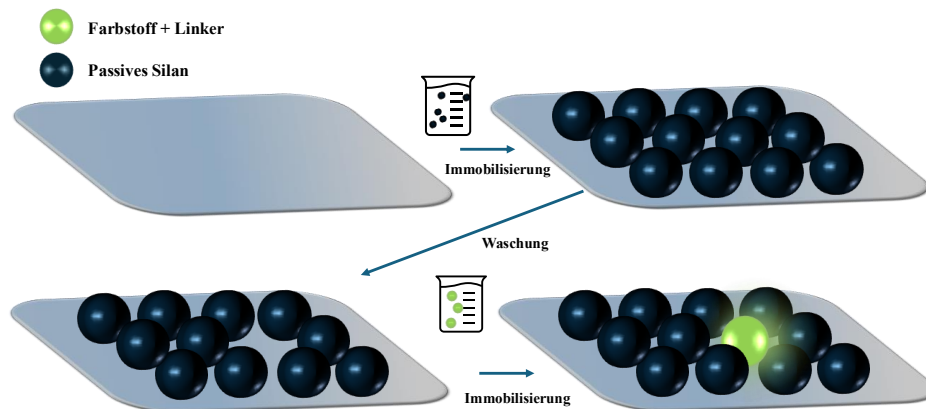


Abbildung 10: Zweistufiges Immobilisierungsschema mit Passivierung und anschließender Immobilisierung des Fluorophors.

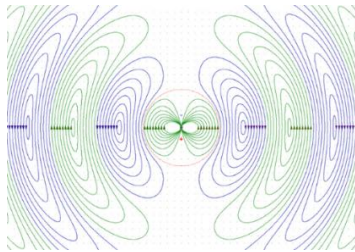
In Experimenten mit Biomolekülen werden vor allem biokompatible Verbindungen wie PEG, Phospholipide oder Tween-20 für die Passivierung verwendet. Diese werden üblicherweise über Biotinylierung funktionalisiert und anschließend an immobilisiertes Avidin, Streptavidin oder Neutravidin gebunden ^[70].

Von apparativer Seite müssen die Probenräger so präpariert werden, dass die Zugabe von Reaktanden während der Detektion möglich ist. Beispiele für einfache Durchflussskammern sind in der Literatur beschrieben und können zum Beispiel durch Zusammenkleben zweier gläserner Probenräger und Kombination mit Pumpensystemen realisiert werden ^[70,90,156,157]. Für TIRFM im Speziellen muss die Reaktion in Lösungsmitteln ablaufen für die Gleichung (18) gilt und der kritische Winkel erreicht wird. Für die Detektion müssen dichroitische Spiegel und Emissionsfilter so ausgelegt sein, dass die Fluoreszenz der Reaktanden effizient voneinander getrennt werden kann.

2.6 Orientierung von Fluoreszenzemittern und der Spezialfall Terrylen in *p*-Terphenyl

Wie bereits zuvor erwähnt, spielt die Orientierung von Fluoreszenzemittern relativ zum Anregungslicht eine große Rolle in ihrer Fähigkeit Strahlung zu absorbieren und zu emittieren. Näherungsweise kann ein chromophores System als Elementardipol beschrieben werden, dessen Emission in einem Medium mit konstantem Brechungsindex einer $\sin^2 \theta$ -Funktion folgt. Dabei beschreibt θ den Winkel zwischen Poynting-Vektor des emittierten Lichts und dem Übergangsdipolmoment. Resultat ist ein rotationssymmetrisch um das Übergangsdipolmoment angeordnetes Emissionsmuster, das in der Literatur oft als “Doughnut”-Muster beschrieben wird. Dabei kann keine Strahlung parallel zum Übergangsdipolmoment in den Raum abgegeben werden ^[130,158–160]. Graphisch ist die Entstehung des Emissionsmusters in Abbildung 11 dargestellt.

a)



b)

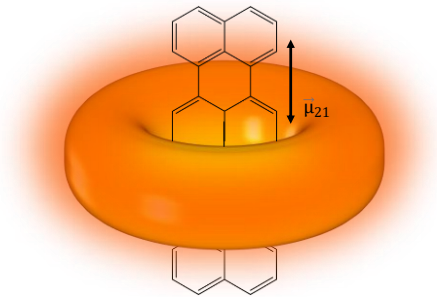


Abbildung 11: a) 2D- & 3D-Ansicht der E-Feld Linien eines Hertz'schen Dipols. Erstellt mit DIPOL-ST ^[161]. b) Schematische Darstellung der Emission eines Fluorophors am Beispiel Terrylen.

Bei Anregung von Emitttern nahe einer Grenzfläche wird ein solches Emissionsmuster verzerrt und Fluoreszenz hauptsächlich in das Medium mit höherem Brechungsindex emittiert ^[88]. Im Fluoreszenzmikroskop wird ein Teil dieser ungleichmäßigen Emission des strahlenden Dipols durch das Objektiv aufgefangen und resultiert in einem Abbild des entsprechenden Intensitätsprofils ^[162]. Im Fall der o-TIRF-Mikroskopie wird die Detektion durch den intrinsischen Unterschied der Brechungsindices und die Anregungsgeometrie begünstigt, da der Probenträger üblicherweise das optisch dichtere Medium darstellt und direkt über dem Objektiv liegt.

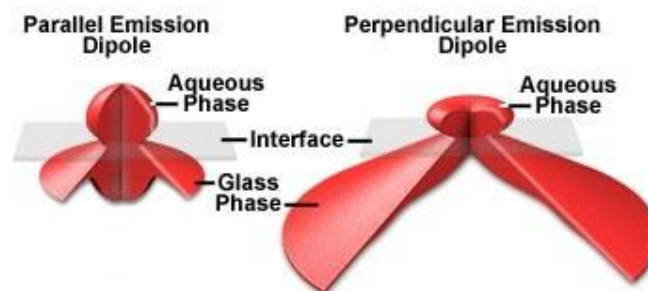


Abbildung 12: Anisotropische Emission eines Emitters an der Grenzfläche mit paralleler und senkrechter Ausrichtung zur Oberfläche ^[163].

Die Orientierung des Moleküls kann anhand der Beobachtung der beschriebenen Emissionsmuster bestimmt werden, wenn die Rotation des strahlenden Dipols durch experimentelle Parameter, wie z.B. die Temperatur oder chemische oder physikalische Immobilisierung, eingeschränkt wird. Für eine Reihe von Farbstoffen ist eine direkte Beobachtung orientierungsabhängiger Emissionsmuster bereits beschrieben ^[127,162,164–166]. Alternativ wurde eine Reihe fortgeschrittener Abbildungsmethoden entwickelt, die zur Bestimmung der Orientierung dienen können ^[27]. Insgesamt können so zum Beispiel wichtige Aufschlüsse auf die Rotationsdynamiken von Molekülen ^[167] oder Bewegungen von molekularen Biomotoren ^[168,169] erhalten werden.

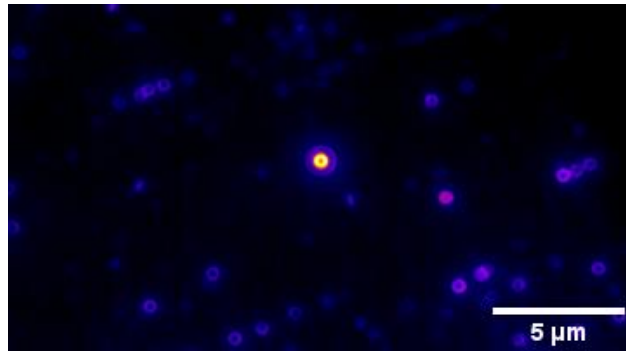


Abbildung 13: "Doughnut"-förmige Emissionsmuster im System Terrylen/*p*-Terphenyl.

Speziell für Terrylen in *p*-Terphenyl wurden Emissionsmuster, wie in Abbildung 13 dargestellt, beobachtet ^[130]. Bei Raumtemperatur ist die Molekülstruktur von reinem *p*-Terphenyl planar und die Kristallstruktur des Systems kann mit der Raumgruppe P21/a beschrieben werden. Bei Temperaturen unterhalb von 193 K findet dagegen eine Ordnungs-Unordnungs-Umwandlung zu einer geordneten triklinen Phase (Raumgruppe C_1) statt ^[170]. Wird eine mit Terrylen dotierte *p*-Terphenyl-Schicht durch Vakuumabscheidung oder Spin Coating auf eine Glasoberfläche aufgebracht, orientieren sich nahezu alle Übergangsdipolmomente, und somit die lange Achse des Moleküls, senkrecht zur Oberfläche. Diese Orientierung wird für Tief- als auch Raumtemperaturexperimente beobachtet ^[130,171,172].

Genauere Studien über das Substitutionsmuster von Terrylen in *p*-Terphenyl wurden vor allem bei tiefen Temperaturen durchgeführt. Dabei wurden vier verschiedene, elektronische Zustände (X_1 - X_4) des Terrylen detektiert, in denen photoinduzierte Sprünge der Absorptionsfrequenz stattfinden können. Die elektronischen Zustände wurden zunächst vier nicht genauer definierten Substitutionsmustern im Kristallsystem zugeordnet ^[173]. In späteren Studien wurden diese Zustände, aus Kombination von experimentellen Daten sowie Ergebnissen von Molekülpackungsberechnungen, vier nicht-äquivalenten Monosubstitutionsstellen in der Tieftemperaturkristallstruktur der Wirtsmatrix zugeordnet ^[138]. Diese entsprechen den vier nicht-äquivalenten *p*-Terphenyl-Positionen in der Elementarzelle ^[170]. Auch bei Raumtemperatur wird das vorgeschlagene Monosubstitutionsmuster durch theoretische Rechnungen unterstützt ^[131]. Die Orientierung ist durch die feste Einbindung in das Kristallgitter besonders stabil und bietet mehrere Vorteile. Zum einen können die Emissionsmuster eindeutig Terrylen zugeordnet werden und Messungen unabhängiger von Verunreinigungen durchgeführt werden. Zum anderen können (Photo-) Reaktionen am System Terrylen in *p*-Terphenyl unter Beobachtung der Orientierung verfolgt werden und Veränderungen im Emissionsmuster oder der Molekülposition detektiert werden. Vor allem durch die besondere Anregungsgeometrie der TIRF-Mikroskopie ist eine besonders effektive Anregung und Detektion bei Verwendung p-polarisierter Laser in diesem System möglich, da die Übergangsdipolmomente ideal für eine Wechselwirkung mit dem E-Feld des elliptisch polarisierten evaneszenten Feldes ausgerichtet sind (siehe Abbildung 14). Dagegen ist die Beobachtung des Systems bei Epifluoreszenz- und konfokaler Mikroskopie zwar beschrieben ^[37,171], durch die ungünstige Anordnung des Anregungslichts jedoch stark beeinträchtigt und nur bei hohen Intensitäten oder leicht geneigter Anordnung des Terrylen im Kristall möglich.

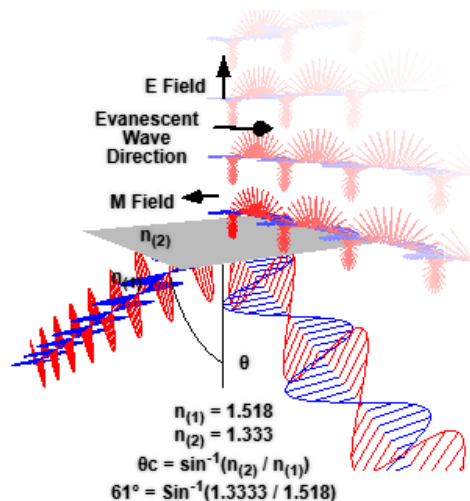
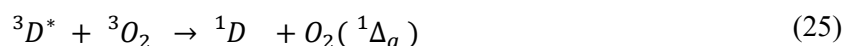


Abbildung 14: Polarisierung des evaneszenten Feldes an einer Glas-Wasser Grenzfläche bei p-polarisiertem Anregungslicht. Generiert mit dem interaktiven Java Tool für TIRF von EVIDENT/Olympus ^[174].

2.7 Photobleichen und die Rolle von Sauerstoff

Eine große Herausforderung in der SMS ist das zeitliche Beobachtungsfenster, in dem Prozesse beobachtet werden können. Konkurrenzprozess für jegliche Abbildungsmethode ist stets sogenanntes Photobleichen. Durch dieses Phänomen ist die Dauer des Beobachtungsfensters stark eingeschränkt ^[125,175,176]. Photobleichen umfasst alle irreversiblen Übergänge in nicht-fluoreszierende Dunkelzustände ^[125]. Eine Vielzahl von Studien hat diese Übergänge untersucht und ordnet die zugrundeliegende Reaktion in den meisten Fällen einer Photooxidation zu, bei der Fluorophore mit reaktivem Singulett-Sauerstoff ($O_2(^1\Delta_g)$) reagieren ^[37,125,128,176–180]. Die mechanistischen Hintergründe und Reaktionspfade des Sauerstoffs und der Farbstoffe sind von besonderem Interesse, da trotz einem grundlegenden Verständnis der genaue Reaktionsmechanismus für viele Moleküle noch im Dunkeln liegt ^[109,181]. Neben zahlreichen vorgeschlagenen Mechanismen konnten einige Übergänge und Zersetzungsprodukte direkt nachgewiesen werden. Allerdings ist Photobleichen stark von den experimentellen Parametern abhängig, z.B. dem umgebenden Medium, der Temperatur, der Anregungswellenlänge oder der Anregungsintensität ^[9]. Die relevanten Wechselwirkungen von angeregten Zuständen des Donors mit Sauerstoff können durch die Gleichungen (23) - (25) ^[182] dargestellt werden.



Singulett-Sauerstoff kann demnach durch Energietransfer des ersten angeregten Triplett- oder des Singulett-Zustandes generiert werden. Alternativ kann Sauerstoff aber auch Interkombinationsübergänge induzieren (Gleichung (24)), wobei kein Singulett-Sauerstoff entsteht ^[183].

Der Prozess aus Gleichung (23) überwiegt, wenn der energetische Abstand von Singulett und Triplettzustand ΔE_{S-T} größer als die Anregungsenergie von $O_2\ ^1\Delta_g$ ist. Für aromatische Farbstoffe wie Perylen und Pyren liegen der Energieabstand und die Lebenszeit des angeregten Singulett-Zustandes τ_s günstig ($\tau_s \geq 1\text{ ns}$, $\Delta E_{S-T} \geq 94\text{ kJ/mol}$) und Singulett-Sauerstoff kann nach Gleichung (23) und (25) über beide Zustände generiert werden^[182]. Eine direkte Erzeugung von Singulett-Sauerstoff über optische Anregung ist spinverboten^[9]. Durch die Triplett-Triplett-Annihilierung aus Gleichung (25) können langlebige Triplettzustände depopuliert werden. Somit sind eventuelle Bleichprozesse aus solchen Zuständen weniger wahrscheinlich. Es konnte für verschiedene aromatische Moleküle wie Terrylen aber gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff ihre Photostabilität sinkt^[9]. Dies kann als Hinweis auf die Beteiligung des Singulett-Zustands am Bleichprozess angesehen werden. Daneben sind Reaktionen mit Sauerstoff auch auf anderen Wegen möglich. Wegen seines niedrigen Redoxpotentials, das oftmals unter dem des LUMO liegt, kann er als oxidierende Spezies mit angeregten Zuständen von Farbstoffen reagieren^[184]. Somit sind Bleichprozesse sowohl aus dem Grund- als auch dem angeregten Zustand über unterschiedliche Mechanismen möglich^[185]. Zusätzliche Zersetzungsprozesse können über Radikale ablaufen, die mit Wechselwirkungen mit der Umgebung gebildet werden. Diese können auch ohne die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff ablaufen und als mögliche Reaktionspfade in Erwägung gezogen werden^[125,176]. Eine große Rolle in der Kinetik des Photobleichens spielt die Anregungsintensität. Bei niedrigen Intensitäten ist davon auszugehen, dass hauptsächlich der erste angeregte Singulett- und Triplettzustand für Zersetzungen verantwortlich sind. Bei ausreichend hohen Intensitäten können Farbstoffe auch höhere elektronische Zustände erreichen, wodurch neue Kanäle für eine Photolyse zur Verfügung stehen^[9,62,125,186,187].

2.8 Die Photooxidation von Terrylen und vergleichbaren Aromaten

Das bereits im vorherigen Kapitel beschriebene Phänomen des Photobleichens beruht auf chemischen Reaktionen mit der Umgebung, vor allem Sauerstoff. Neben einer ungewollten Konkurrenzreaktion bietet der Prozess aber auch die Chance, mit einem geeigneten Versuchsaufbau Einblicke in einzelne Schritte und Intermediate des Bleichprozesses, und somit den Oxidationsprozess selbst, oder wertvolle Information über den bleichenden Farbstoff zu erlangen. Vor allem an aromatischen Kohlenwasserstoffen wurden bereits vielfältige Untersuchungen des Bleichprozesses durchgeführt. Häufige Photooxidationsprodukte sind Endoperoxide, die in einer Cycloaddition von Sauerstoff gebildet werden und bereits für über 400 aromatische Systeme beschrieben sind ^[188–190]. Die Reaktivität aromatischer Verbindungen gegenüber Singulett-Sauerstoff nimmt mit der Elektronendichte und der Größe des Ringsystems zu. Für eine Reihe von Anthracenen und Tetracenen konnte zudem gezeigt werden, dass die Reaktion reversibel ist, wobei das Endoperoxid in den ursprünglichen Aromaten sowie Triplett- oder Singulett-Sauerstoff zerfällt ^[189,191–193]. Als eines der ersten untersuchten Systeme ^[194], stellt Terrylen in *p*-Terphenyl ein robustes Instrument für die Einzelmolekülspektroskopie dar. Besonders aufgrund der hohen Photostabilität, Fluoreszenzquantenausbeute und Sättigungsintensitäten wird es seit Jahrzehnten für Studien genutzt ^[37,129,130,172,195,196]. Photobleichen ist aber auch für Terrylen und seine Derivate bekannt ^[37,130]. Für Benzoterrylen wird die Bildung eines Endoperoxids und anschließende Cycloreversion berichtet ^[189]. TDI ist ein weiteres, hochstabiles Derivat, dessen Photooxidation in mehreren Studien untersucht wurde ^[197,198]. Polystyrolfilme wurden dazu mit Farbstoff dotiert und mit 633 nm belichtet, wobei geblichene Areale eine hypsochrome Emission aufzeigten. Einzelmolekülspektren aus diesen Experimenten deuten auf die Bildung verschiedener Spezies und Dunkelzustände hin, die mit den für Terrylen berichteten Strukturen übereinstimmen ^[198]. Mittels DFT-Berechnungen zu Reaktionspfaden des TDI mit Singulett-Sauerstoff konnten mögliche Zwischenstufen und Reaktionsprodukte näher ermittelt werden (Abbildung 15). Im Molekülgerüst des TDI stehen unterschiedliche Positionen für einen Angriff des Sauerstoffs zur Verfügung. Die häufigsten Produkte werden einem TDI Diepoxid zugeschrieben, dessen Emission 70 nm blauverschoben ist, einem TDI Diepoxid mit 160 nm hypsochromer Verschiebung sowie einem Exoperoxid mit 175 nm hypsochromer Verschiebung. Die berechneten Energieprofile zeigen, dass Endoperoxide energetisch ungünstig liegen und daher in stabilere Diepoxide umlagern können ^[197]. Die Umlagerung läuft über biradikale Zwischenstufen ab ^[197], wie auch bereits für Anthracen und seine Derivate experimentell nachgewiesen und beschrieben ^[189]. Mittels Anregung im UV-Bereich und Generierung von Singulett-Sauerstoff auf einer TiO₂-Oberfläche konnte das Hauptprodukt der Photooxidation von TDI mit 70nm Blauverschiebung nachgewiesen werden, wobei jedoch kein eindeutiger Strukturnachweis erbracht werden konnte ^[109].

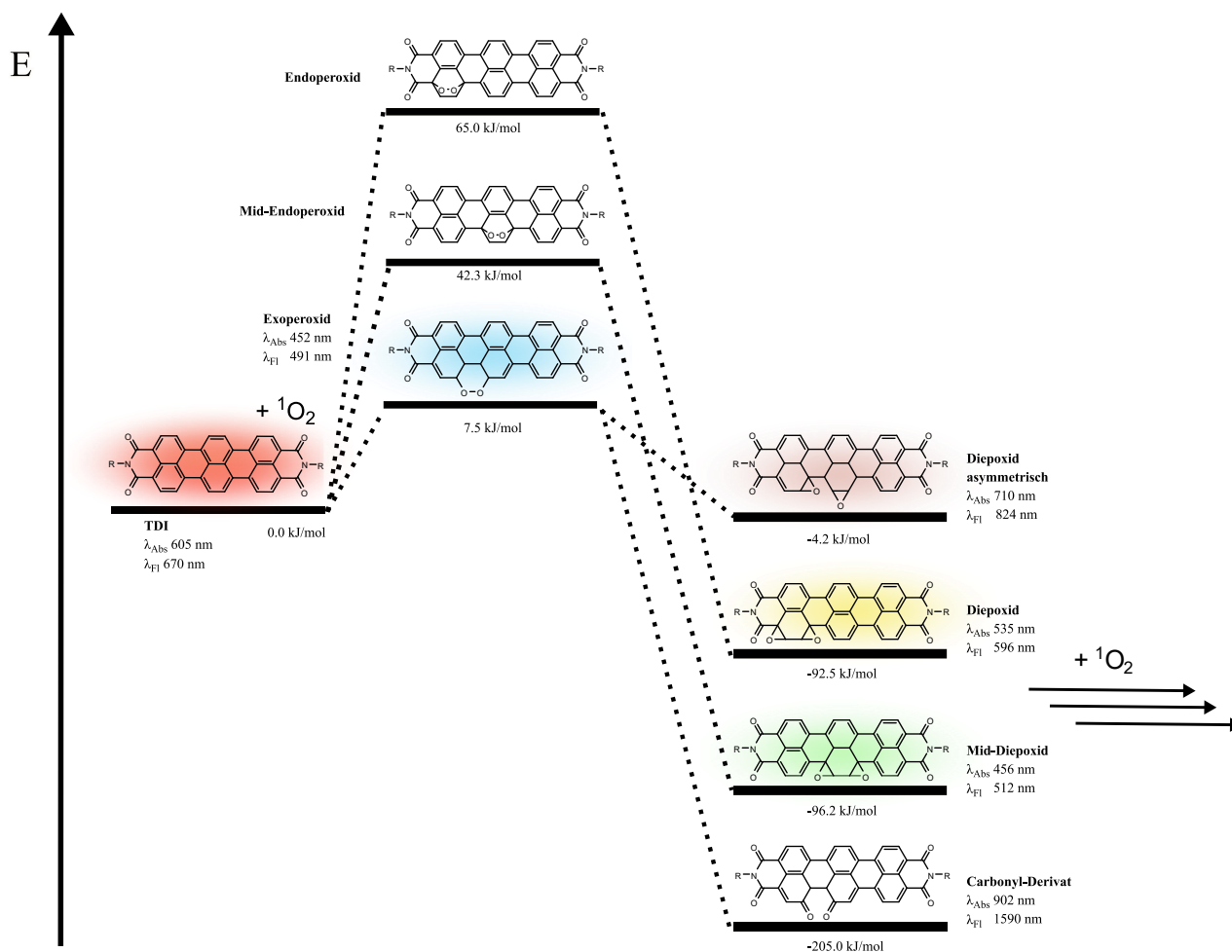


Abbildung 15: Vereinfachtes Reaktionsschema von TDI mit $^1\text{O}_2$. Energetische Abstände der Intermediate und Produkte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur qualitativ dargestellt. Adaptiert aus [197].

Für die vermutlich selbst-sensibilisierte Photooxidation des Terrylen konnten im Laufe diverser Studien bereits verschiedene Reaktionsprodukte nachgewiesen werden, allerdings ist das Reaktionsschema noch nicht vollständig verstanden. Zum Teil sind nur spektrale Verschiebungen bekannt, ohne dass Informationen über deren Struktur vorliegen. Die Strukturen von detektierten Photolyseprodukten aus früheren Studien konnten durch theoretische Rechnungen unterstützt werden. Dabei wurden von Basché et al. [37] folgende Schlussfolgerungen gezogen, die in Abbildung 16 zusammenfassend dargestellt sind:

Die selbstsensibilisierte Photooxidation des Terrylen führt, analog zu ähnlichen Aromaten [199], entweder zu einem Endo- oder Exoperoxid. Endoperoxide sind dabei weniger stabil und durchlaufen einen biradikalen Zwischenzustand, der zu einem Diepoxid führt. Überwiegend wird in Einzelmolekülexperimenten an Terrylen einstufiges Photobleichen (engl. *one step photobleaching*, OSPB) beobachtet, wobei die Intensität des beobachteten Moleküls auf einer Zeitskala von Sekunden bis einigen Minuten auf das Niveau des Hintergrunds fällt. Dieser einstufige Abfall wird der Bildung des Exoperoxids zugeordnet, dessen Absorptionsmaximum mit 100 nm Blauverschiebung außerhalb der Resonanz einer Anregungswellenlänge von 488 nm liegt. Eine kleine Fraktion der Moleküle zeigt aber sogenanntes zweistufiges Photobleichen (engl. *two step photobleaching*, TSPB).

Dabei verschwinden die Moleküle in kurzlebige Dunkelizustände und leuchten wieder auf, wobei das Intensitätsniveau im Vergleich zum Ausgangszustand verändert ist. Sekundäre Photooxidationsschritte mit Sauerstoff führen schließlich dazu, dass auch diese Moleküle in irreversible Dunkelizustände übergehen. Basché et al. fanden Hinweise darauf, dass das Hauptprodukt der zweistufigen Photooxidation des Terrylen in ihrem konfokalen Aufbau ein Diepoxid ist, dessen Fluoreszenz um circa 40 nm hypsochrom verschoben ist. Den kurzlebigen Dunkelizustand schrieben sie einem nicht-fluoreszierenden Endoperoxid zu, dessen theoretisches Absorptionsmaximum um circa 70 nm hypsochrom zum Terrylen verschoben ist.

Ein analog zum TDI auftretendes Mid-Endoperoxid ist laut quantenmechanischen Rechnungen hingegen nicht stabil und sollte als Produkt der Photooxidation nicht auftreten können ^[37]. Über ein entsprechendes asymmetrisches Diepoxid sind keine Informationen bekannt. Zusätzliche Produkte unbekannter Natur liegen bei einer hypsochromen Verschiebung von circa 70-85 nm und treten in gleicher Häufigkeit wie das Diepoxid auf. Zudem können vereinzelt kleinere Verschiebungen im Bereich von 25 nm (bathochrom) und 10-30 nm (hypsochrom) detektiert werden ^[200].

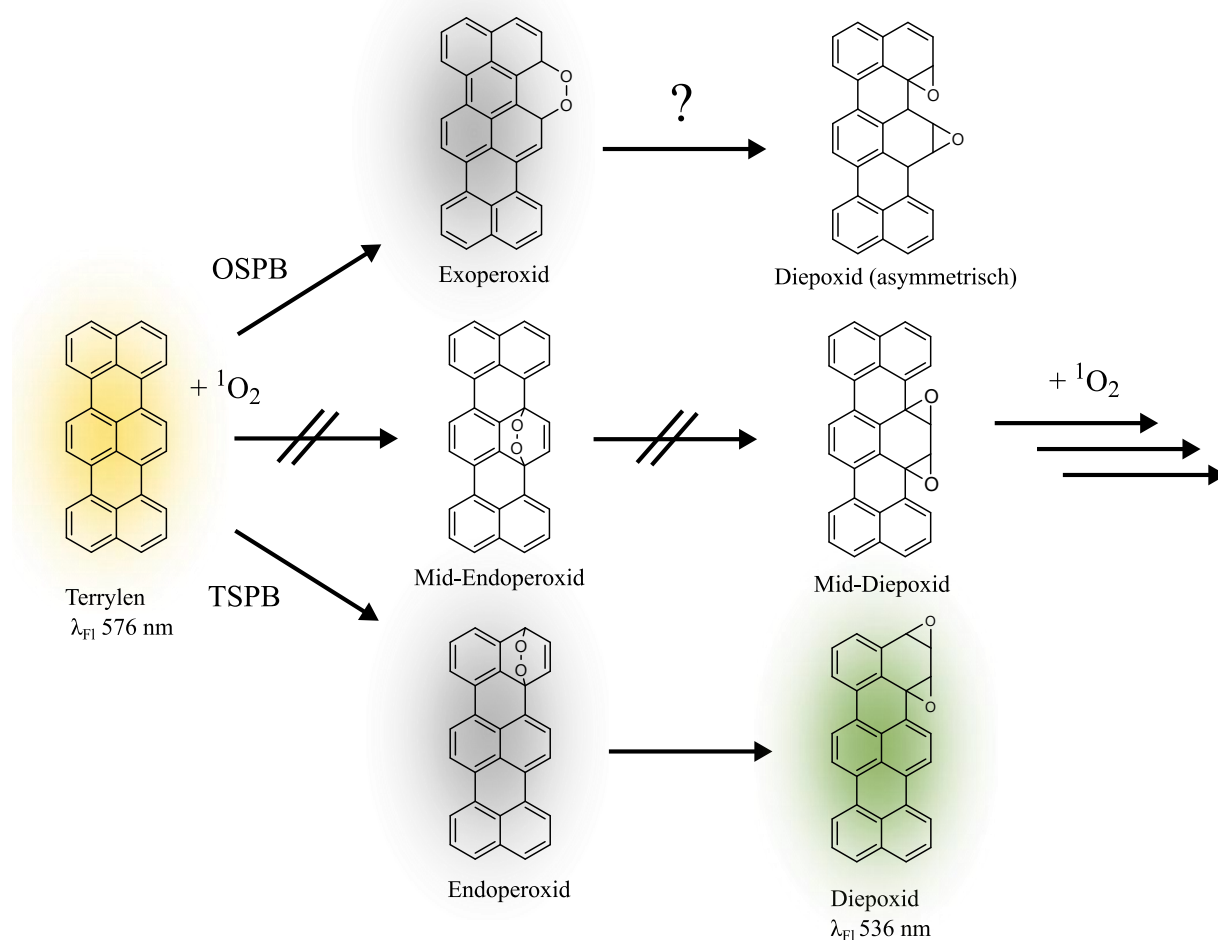


Abbildung 16: Reaktionsschema der Photooxidation von Terrylen nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft.

2.9 Photosäuren und Schutzgruppenchemie – Sonden für die Reaktionsverfolgung im Zweifarbensystem

Neben den größtenteils einfachen aromatischen Farbstoffen, die in den vorherigen Abschnitten behandelt wurden, existieren komplexere Verbindungen, die interessante Ansätze für die Einzelmolekülchemie mit sich bringen. Aromatische Photosäuren sind Verbindungen mit einem aziden Proton, deren Säurestärke im angeregten Zustand (pK_s^*) mehrere Größenordnungen über der des elektronischen Grundzustands liegen kann. Mit einem geeigneten Akzeptor, z.B. dem verwendeten Lösungsmittel, ist somit der Protonentransfer im angeregten Zustand (engl. *excited state proton transfer*, ESPT) möglich. Durch die hohe Azidität des angeregten Zustands und der im Vergleich deutlich schnelleren Übertragung des Protons, wird die Fluoreszenz von der deprotonierten Spezies emittiert. Im Grundzustand sind die Verhältnisse umgekehrt und ein Proton wird auf die Basenform übertragen^[201,202]. Interessanterweise unterscheidet sich die Fluoreszenzwellenlänge der deprotonierten maßgeblich von der protonierten Spezies. Grund für die bathochrome Verschiebung der Basenform ist die energetisch günstigere Lage im angeregten Zustand, die einer Stabilisierung durch Ladungsverschiebung zugeschrieben wird^[203–205]. Anhand eines einfachen thermodynamischen Schemas, dem Förster-Zyklus, können die beteiligten Energieniveaus und der Kreislauf des Protonentransfers dargestellt werden^[206,207]. Abbildung 17 zeigt beispielhaft die elektronischen Spektren einer Photosäure sowie den dazugehörigen Förster-Zyklus. Seit der Entdeckung der Photoazidität wurden solche Systeme stetig weiterentwickelt, was in der Entdeckung und Synthese der Superphotosäuren ($pK_s^* < 0$) gipfelte, deren Säurestärken im Bereich von konzentrierter Schwefelsäure und darüber liegen^[208,209]. Beachtenswert ist auch die erfolgreiche Synthese einer Photosäure (Abbildung 18, HPDE-Cl) mit einem Säurechlorid als funktionelle Gruppe in Position 6, die leicht mit APTES verknüpft werden kann und somit zur Immobilisierung geeignet ist^[210]. Eine Übersicht weiterer relevanter Photosäuren dieser Arbeit zeigt Abbildung 18.

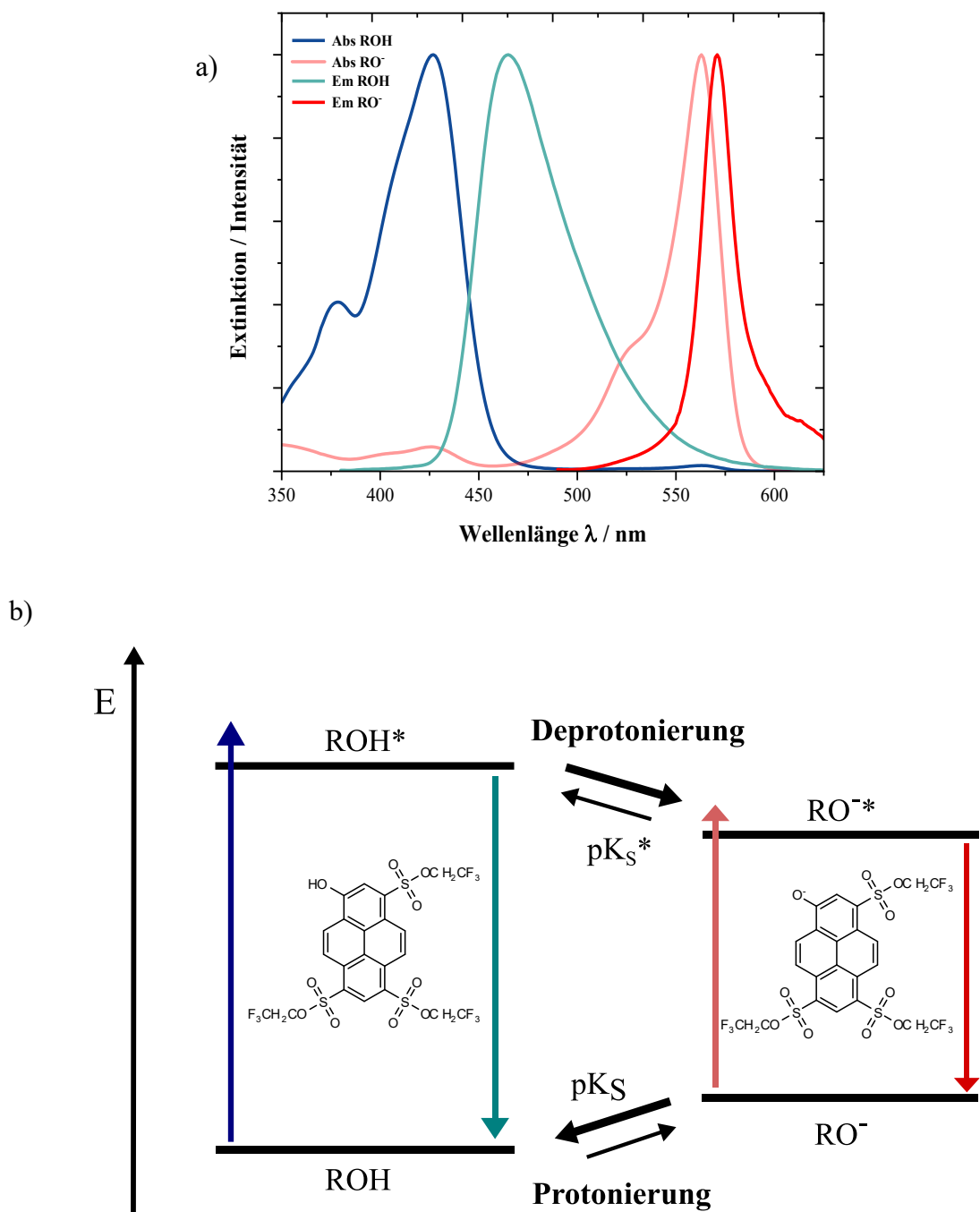


Abbildung 17: a) Darstellung Absorptions- und Emissionsspektrum von HPTE in Acetonitril. b) korrespondierender Förster-Zyklus.

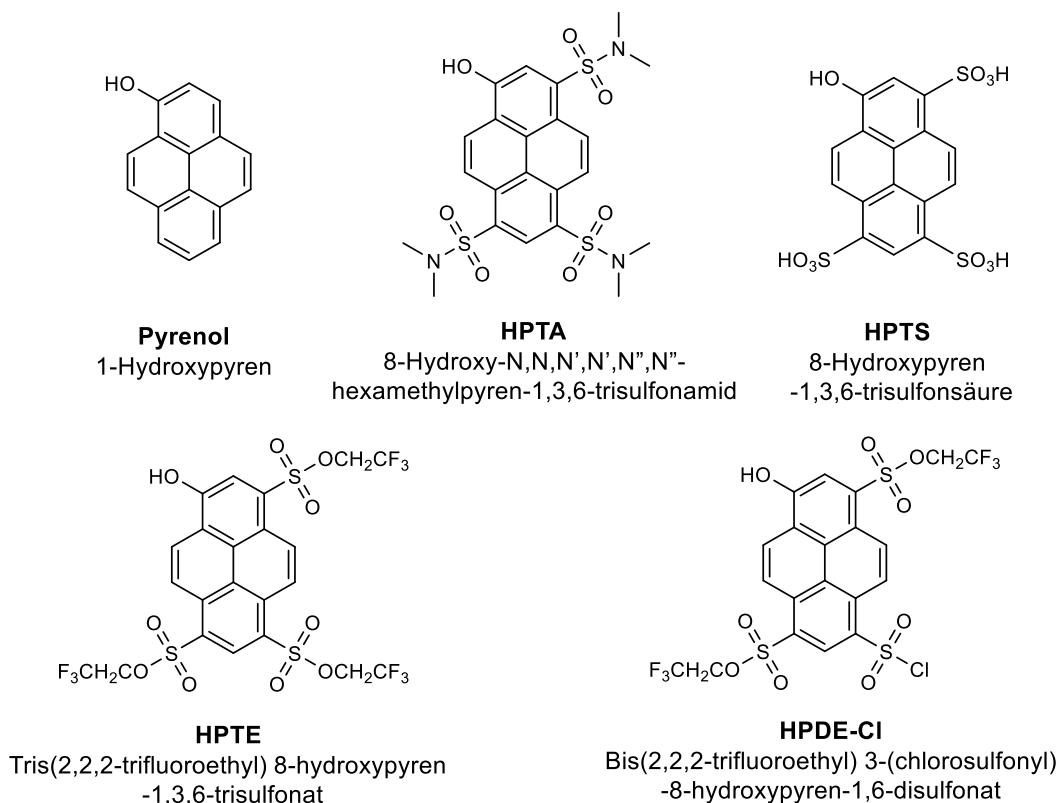


Abbildung 18: Übersicht wichtiger Photosäuren und geläufige Abkürzungen. Zu Details der Synthese wird auf die Arbeiten der AG Jung verwiesen ^[210,211].

Neben Werkzeugen zur Untersuchung der Photoazidität und des Mechanismus des Protonentransfers selbst ^[212,213], stellen Photosäuren einfache dual-emissive Sonden dar. Bei geeigneter Modifizierung lassen sie sich ideal zur Untersuchung von Reaktionen funktionalisieren ^[35,214]. Für Photosäuren auf Basis von 1-Pyrenol bietet die Hydroxylgruppe eine offensichtliche Möglichkeit zur Modifizierung. Dabei kann analog zum ESPT ein Farbwechsel zwischen der Fluoreszenz der modifizierten Photosäure und der Basenform beobachtet werden. Eine weit verbreitete Funktionalisierung von OH-Gruppen ist die Schützung mit Silylethern in der organischen Chemie. Durch sterisch anspruchsvolle Substituenten wird ein Angriff am Siliziumatom verhindert und die geschützte Verbindung ist gegenüber Hydrolyse, Oxidationen oder Reduktionen in nachfolgenden Syntheseschritten geschützt ^[215]. Die Strukturen und relativen Stabilitäten der häufigsten Silylierungsmittel sind in Abbildung 19 dargestellt. Im allgemeinen Reaktionsschema nach der Corey Methode, die 1972 erstmals beschrieben wurde, wird DMF als Lösungsmittel sowie Imidazol als Hilfsbase und Katalysator verwendet (Abbildung 20). Dabei wurde zunächst angenommen, dass die Reaktion über ein Silylimidazol als reaktives Silylierungsmittel verläuft ^[216]. Alternative Katalysatoren können 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP), 4-(1-Pyrrolidiny)pyridin (PPY) oder N-Methylimidazol sein ^[217]. Eine einfache selektive Abspaltung gelingt mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) ^[216].

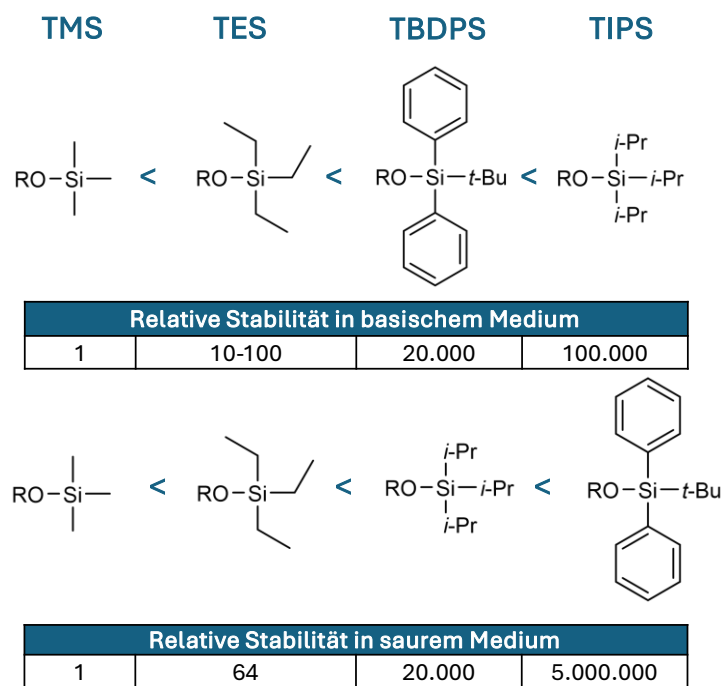


Abbildung 19: Relative Stabilitäten von Silylethern gegenüber basischen und sauren Bedingungen ^[215].

Die Reaktion wurde seitdem vielfach modifiziert und hauptsächlich für die Schützung primärer und sekundärer Alkohole genutzt. Neuere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass Hilfsbasen nicht direkt am katalytischen Zyklus teilnehmen, sondern lediglich den Katalysator regenerieren und die freigesetzte Säure neutralisieren. Zudem wird die Reaktion durch DMF selbst katalysiert und die Zugabe eines externen Katalysators ist nicht zwingend notwendig. In apolaren organischen Lösungsmitteln wie DCM ist mit langsameren Reaktionszeiten zu rechnen ^[217]. Mit der Verkade-Base ist eine milde Silylierung für eine Vielzahl von primären, sekundären Alkoholen und Phenolen, einschließlich säureempfindlicher, basenempfindlicher und sterisch gehinderter Substrate möglich. Die Schützung gelingt dabei unter Verwendung von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) und *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Cl). Hiermit sind höhere Ausbeuten erreichbar und DMF kann durch zweckmäßigere Lösungsmittel wie Acetonitril ersetzt werden ^[218]. Vor allem unter dem Gesichtspunkt der Beobachtung auf dem Einzelmolekülniveau ist dies aufgrund des niedrigeren Brechungsindex ein deutlicher Vorteil. Verkade Basen besitzen deutlich höhere Basizitäten im Vergleich zu anderen Aminen wie NEt₃, DBU oder DBN, bedingt durch die hohe Stabilität der protonierten Form. Der pK_s-Wert der korrespondierenden Säure konnte mit 32.90 in Acetonitril ermittelt werden ^[219]. Der Mechanismus der Silylierung verläuft analog zum literaturbekannten Mechanismus ^[220,221], wie in Abbildung 21 dargestellt. Es wird angenommen, dass die Silylgruppe nur schwach von der Verkade-Base gebunden wird und somit einen nukleophilen Angriff des Alkohols erleichtert. Bisherige Untersuchungen zu Silylgeschützten Pyrenolen sind begrenzt. In Vorarbeiten konnte von B. Finkler erfolgreich ein TBDMS- als auch TBDPS-geschütztes Derivat der Photosäure HPTA als Zwischenstufe hergestellt werden. Die Reaktion gelang dabei in DCM mit 3.2 eq Imidazol und 1.25 eq Silylierungsmittel.

2 Theoretische Grundlagen

Unter basischen Bedingungen konnte in nachfolgenden Syntheseschritten eine Abspaltung der Schutzgruppe beobachtet werden ^[211]. Weitere Reaktionen mit Photosäuren oder die direkte Untersuchung silyl-geschützter Derivate sind bisher nicht bekannt. Auf makroskopischer Ebene könnten solche dual-emissiven Sonden für die selektive Detektion von Analyten, z.B. von Fluoridionen, genutzt werden. Entsprechende Farbstoffsysteme sind bereits in der Literatur beschrieben und könnten durch die überlegenen Nachweisgrenzen der Fluoreszenz übertroffen werden ^[222].

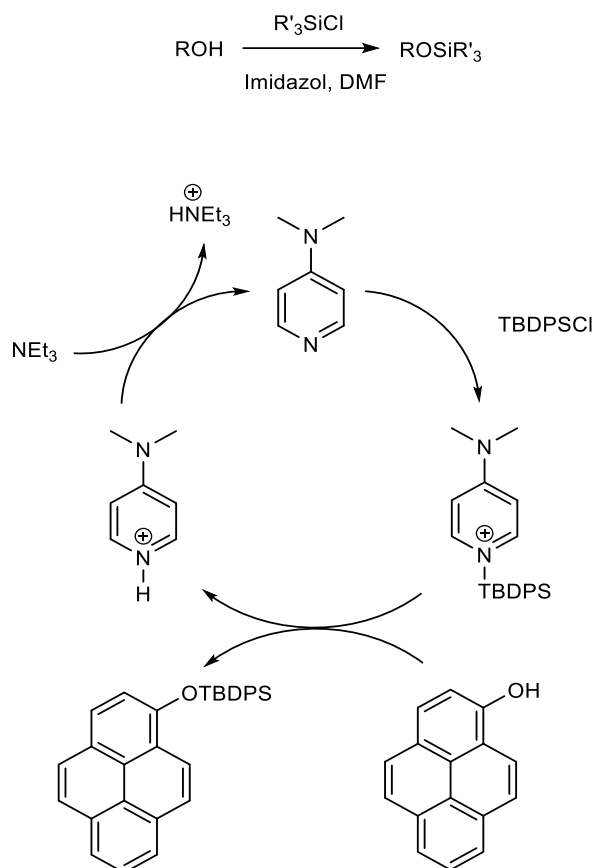


Abbildung 20: Allgemeines Reaktionsschema der Silylierung von Alkoholen und Mechanismus ^[221] am Beispiel von 1-Hydroxypyren.

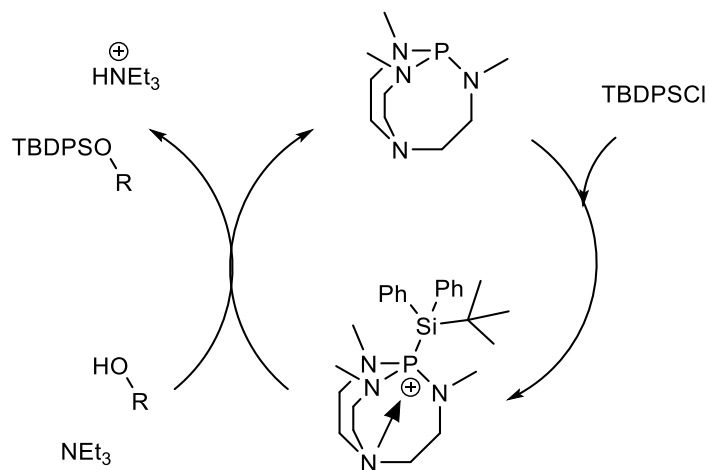


Abbildung 21: Mechanismus der Silylierung mittels Verkade Base ^[218].

3 Ergebnisse & Diskussion

3.1 Die Photooxidation von Terrylen in *p*-Terphenyl – Modellsystem für die Grenzfläche Fest/Gasförmig

Kapitel 3.1 befasst sich mit den durchgeführten Untersuchungen zur Photooxidation des Farbstoffs Terrylen in der kristallinen Matrix *p*-Terphenyl. Ziel war es, das Grundkonzept vorhergehender Studien der AG Basché^[37,200] auf die TIRF-Mikroskopie zu übertragen und sich dabei die Vorteile der Weitfeldmikroskopie zu Nutze zu machen. Daraus sollten neue Erkenntnisse über den Ablauf der Photooxidation erlangt werden. Neben einer kurzen Vorstellung der allgemeinen Eigenschaften des Farbstoffs werden jene Schritte geschildert, die durchgeführt wurden, um zunächst Terrylen erfolgreich in *p*-Terphenyl detektieren und schließlich die Reaktion effektiv mittels TIRFM verfolgen zu können. Abschließend werden die Ergebnisse der Einzelmoleküluntersuchungen vorgestellt und diese im Kontext des Kenntnisstandes der Wissenschaft analysiert. Experimentelle Details zu den Methoden sind in Kapitel 4.2.4 aufgeführt. Parallel zu den hier dargestellten Ergebnissen wurden Experimente mit einem ähnlichen Studiendesign von Mhanna et al.^[80] veröffentlicht.

3.1.1 Charakterisierung im Ensemble

Abbildung 22 zeigt das Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektrum von Terrylen, das in Toluol aufgenommen wurde und ein Absorptionsmaximum bei 559 nm sowie Emissionsmaximum bei 568 nm zeigt. Literaturwerte für Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient liefern Werte für $\Phi_{\text{Fl}} = 0.70$ und $\epsilon_{\lambda,560} = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[223,224]. Die Triplettquantenausbeute des Moleküls ist vergleichsweise niedrig und liegt im Bereich von 10^{-5} ^[129].

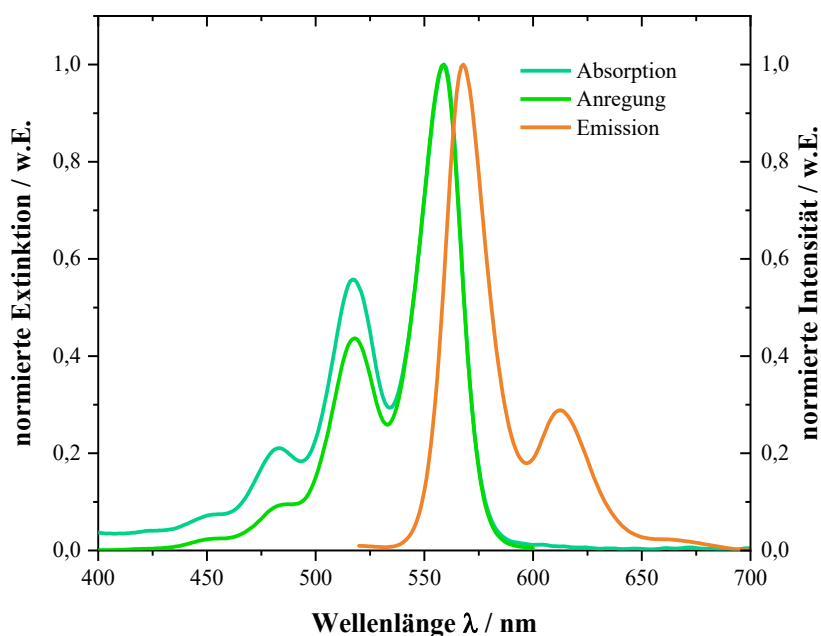


Abbildung 22: Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektrum von Terrylen in Toluol. $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$.

Einhergehend mit der Einbettung in kristallinem *p*-Terphenyl war eine Umgebungsabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von Terrylen zu erwarten. Abbildung 23 zeigt den Vergleich zwischen Emissionsspektrum im Ensemble in *p*-Terphenyl und Toluol. Im Kristall konnte eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums um 13 nm zu 581 nm beobachtet werden, die in gutem Einklang mit Emissionswerten aus ähnlichen Arbeiten steht [200].

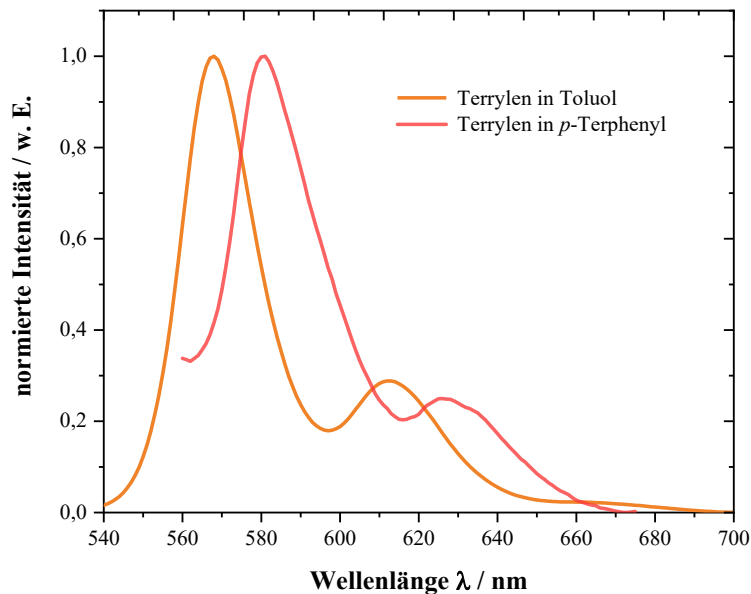


Abbildung 23: Emissionsspektrum von Terrylen in Toluol im Vergleich zu *p*-Terphenyl. Das Ensemblespektrum in fester Matrix wurde von A. Grandjean aufgenommen und zur Verfügung gestellt. Siehe auch [225].

3.1.2 Optimierung der Probenvorbereitung

Erste Aufnahmen im TIRF zeigten, dass die Belegungsdichte der Proben je nach Präparationsart stark unterschiedlich ausfallen konnte. Der experimentelle Aufbau des TIRF wurde daher optimiert und eine geeignete Methode zur Probenvorbereitung und Detektion von Terrylen ermittelt. Als Probensystem diente *p*-Terphenyl, das mit Terrylen dotiert und auf Deckgläser aufgebracht wurde. Um eine möglichst dünne Kristallschicht aus *p*-Terphenyl zu erzeugen, wurden Verdampfung des Lösungsmittels, Vakuumabscheidung als auch Spincoating getestet. Dabei konnte eine modifizierte Methode des Spincoating identifiziert werden, mit der die Oberfläche der Deckgläser zunächst mit einer nanomolaren Lösung von Terrylen und *p*-Terphenyl betropft wurden. Anschließend wurde die Lösung durch Kippen des Deckglases abfließen gelassen und nur der verbleibende Rest zum Spincoatig verwendet. Im Vergleich zum Spincoating mit dem gesamten Probenvolumen konnten auf diesem Wege deutlich bessere Verteilungen und reproduzierbare, dünne Kristallschichten realisiert werden. Eine Übersicht repräsentativer Probenmorphologien anhand exemplarischer Fluoreszenzaufnahmen zeigt folgende Abbildung:

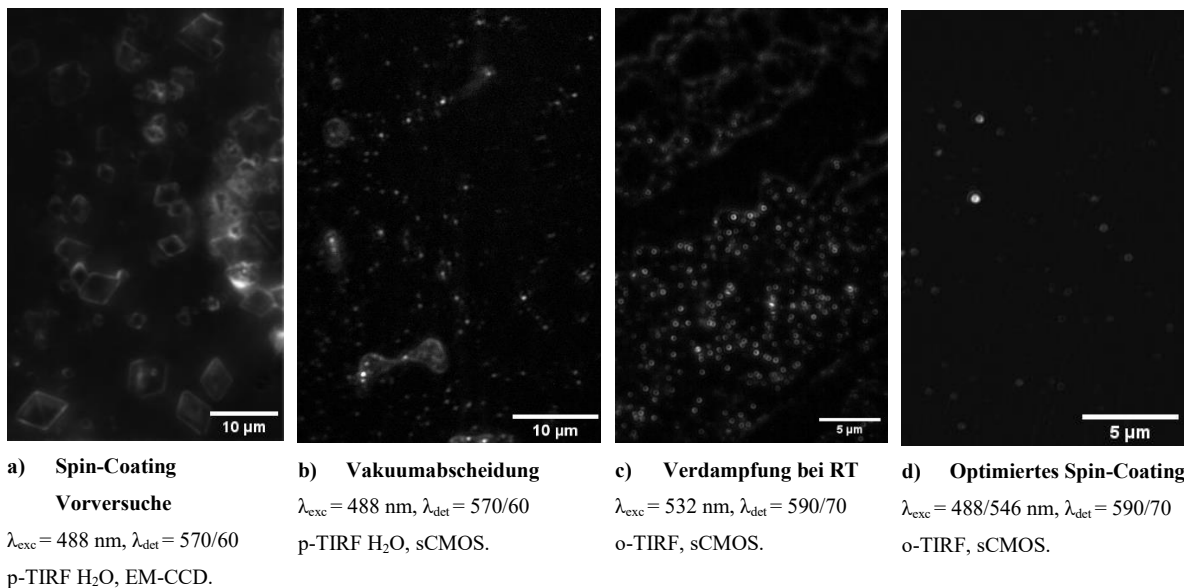


Abbildung 24: Übersicht der Probenvorbereitungsexperimente von Terrylen in *p*-Terphenyl unter verschiedenen Anregungs-/Detektionsbedingungen. Gezeigt sind gemittelte Aufnahmen der ROI über 2 min.

Mittels Vakuumabscheidung aus einer pulverisierten Mischung von *p*-Terphenyl und Terrylen konnte keine zufriedenstellende Probenmorphologie erreicht werden. Dies ist dem langsameren Wachstum der Kristalle zuzuschreiben. Oftmals wurden große, weit verteilte Kristalle sowie dunklere Bereiche ohne Emissionsmuster beobachtet. Auch einfaches Verdampfen aus der Lösung führte auf den Deckgläsern zu großen, kristallinen Bereichen mit hoher Belegungsichte. Aufnahmen der Proben unter Raumbeleuchtung ermöglichten die Beobachtung der Kristallstruktur analog zu einem Lichtmikroskop. Diese bestand in den verwendeten Proben nicht aus einer flächendeckenden Oberflächenbeschichtung, sondern aus kleineren, kristallinen Bereichen, die sich mit größeren Bereichen unbeschichteter Glasoberfläche abwechselten (Abbildung 25, rechts).

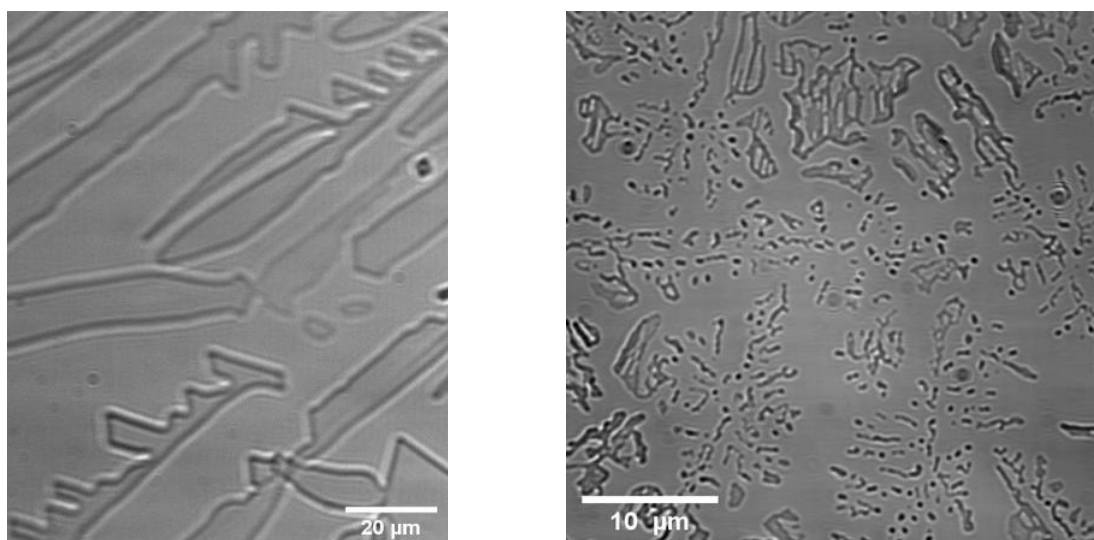


Abbildung 25: Vergleich der Spincoating Methoden unter „Lichtmikroskop“-Bedingungen. Links: Spincoating des gesamten Probenvolumens. Rechts: Optimiertes Spincoating.

Eine Überlagerung der Aufnahmen aus Licht- und Fluoreszenzmikroskopie der gleichen ROI im TIRFM zeigte, dass sich Terrylen hauptsächlich in den detektierten Strukturen anlagert, die folglich *p*-Terphenyl Kristalle darstellen (Abbildung 26).

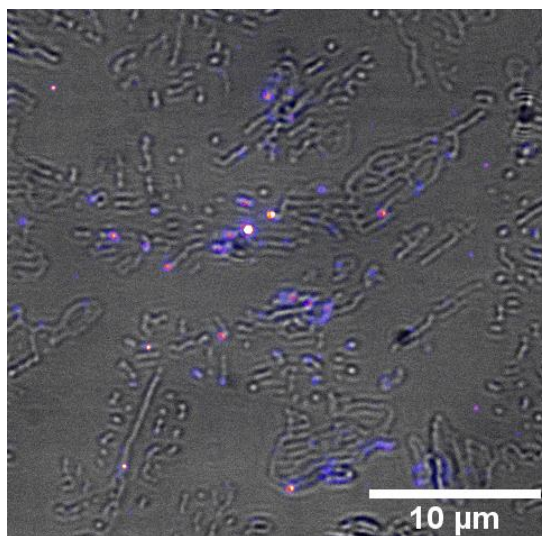


Abbildung 26: Überlagerte Aufnahmen einer Terrylen/*p*-Terphenyl Probe mit Raumlicht und unter o-TIRF-Bedingungen. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ($P = 15 \text{ mW}$); $\lambda_{\text{det}} = 540\text{-}600 \text{ nm}$. Fluoreszenzaufnahme in Pseudofarben.

Aus den Experimenten zur Probenvorbereitung stellte sich heraus, dass mittels EMCCD-Kamera keine Emissionsmuster in der Kristallmatrix detektierbar waren, da die Pixelgröße des Sensors mit $16 \mu\text{m}$ zu groß ausfällt. Großer Vorteil der Detektion der Emissionsmuster war die höhere Richtigkeit und Selektivität der Ergebnisse, da der Analyt eindeutig gegenüber eventuellen Verunreinigungen detektiert werden konnte. In allen Proben waren, trotz der hohen Ordnung im Kristallsystem, Unterschiede in den Helligkeiten der Terrylenmoleküle zu erkennen. Diese können unterschiedlichen Abständen zur Grenzfläche zugeschrieben werden, wobei helle Moleküle wegen der Abstrahlcharakteristik des Dipols vermutlich näher an der Glasoberfläche liegen. Eine erfolgreiche Detektion von Terrylen gelang mit verschiedenen Wellenlängen und Filterkombinationen, ermöglicht durch die hohe Stabilität, Signalstärke sowie einem ausgezeichneten SNR.

Neben der o-TIRF Methode konnte prinzipiell auch p-TIRF für die Abbildung von Terrylen verwendet werden. Mehrere Gründe sprachen allerdings dafür, die o-TIRF Methode gegenüber p-TIRF zu bevorzugen. Durch die Anordnung von Objektiv und Probe war die Detektion im p-TIRF nur im flüssigen Medium möglich, welches einen unbekannten Einfluss auf die Photooxidation im Kristall haben könnte. Ebenso sprachen das Auftreten von Drift, der Verlust der Fokussierung und die bereits im theoretischen Teil geschilderten Nachteile in der Probenvorbereitung gegen eine Verwendung. Insgesamt waren mit o-TIRF über mehrere Messungen konstante Anregungsbedingungen und eine hohe Reproduzierbarkeit zu garantieren, weshalb diese Methode, vor allem für die Untersuchungen zur Photooxidation, in Verbindung mit sCMOS-Kameras verwendet wurde.

3.1.3 Detektion und Charakterisierung auf dem Einzelmolekülniveau

Die Studien auf dem Einzelmolekülniveau wurden an einem selbst-konstruierten TIRF-Mikroskop durchgeführt, das bereits in früheren Studien ^[35,226,227] etabliert wurde und für die vorliegenden Experimente, wie in Kapitel 4.2 geschildert, modifiziert wurde. Abbildung 27 zeigt einen Bildausschnitt einer TIRF-Aufnahme der Proben. Nahezu alle Moleküle zeigten die erwarteten „Doughnut“-Emissionsmuster in unterschiedlichen Helligkeiten mit begleitenden Beugungsscheibchen, wobei, je nach Filter und Anregungsquelle, bis zu vier Nebenmaxima detektiert werden konnten. Nur für vereinzelte Moleküle wurde ein vollständig radialsymmetrisches Emissionsmuster beobachtet. Für den überwiegenden Teil wurde eine leichte Asymmetrie beobachtet, wie im Beispiel in Abbildung 27 zu sehen. Dies deutet auf eine leichte Verkippung des Übergangsdipolmoments relativ zur z-Achse hin. Neben dem Auftreten von Emissionsmustern belegt die Zeitspur des Moleküls den Einzelmolekülcharakter der detektierten Signale, erkennbar durch den einstufigen Abfall des Signals auf das Niveau des Untergrunds bei $t = 25$ s.

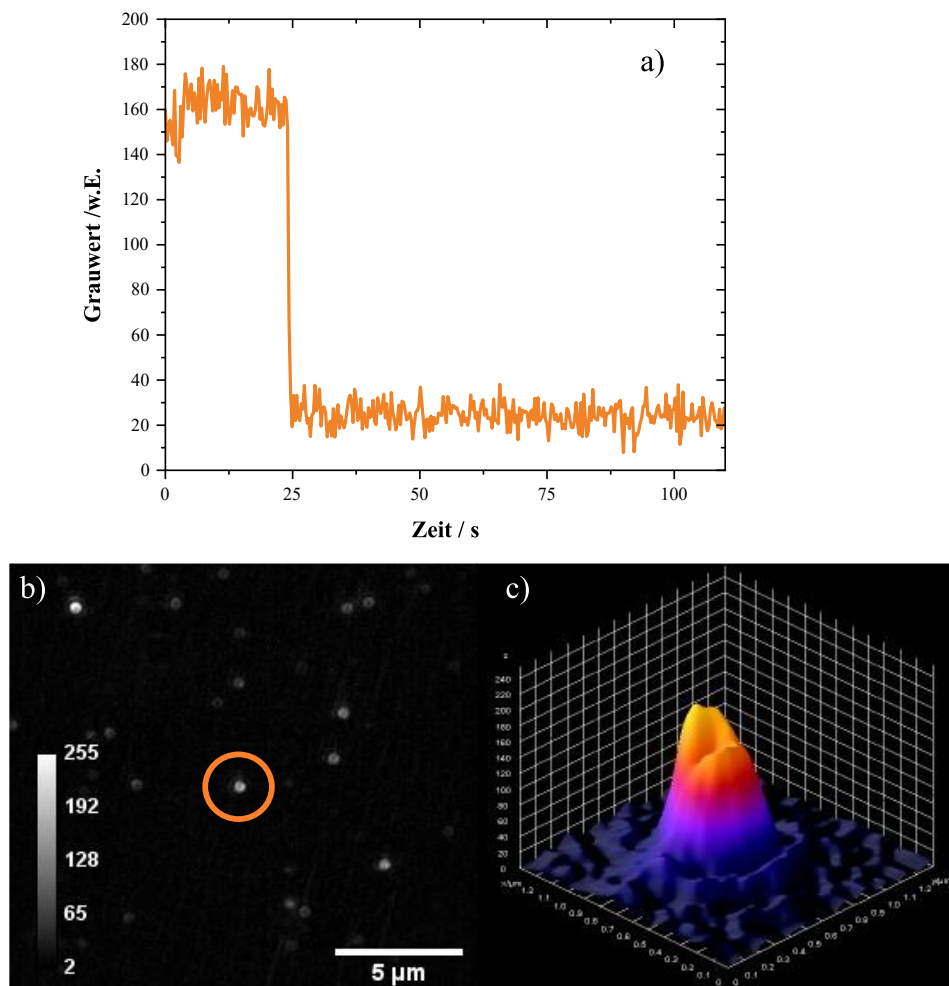


Abbildung 27: a) Einzelmolekülspur, b) TIRF-Aufnahme c) 3D-Profil von Terrylen in *p*-Terphenyl. Kalibrierung der Helligkeit in Grauwerten. 3D Oberflächenprofil des Moleküls eingefärbt in Pseudofarben. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546$ nm ($P = 15/5$ mW); $\lambda_{\text{det}} = 555\text{-}625$ nm; o-TIRF.

Zur Bestimmung des lateralen Auflösungsvermögens der verwendeten Apparatur eigneten sich die detektierten Emissionsmuster weniger gut, da das fehlende Peakmaximum und die Asymmetrie hinderlich für eine Anpassung mit Gaußfunktionen war. Zur Bestimmung der maximalen experimentellen Auflösung wurden deshalb Quarzdeckgläser mit Terrylen ohne *p*-Terphenyl beschichtet und unter dem TIRF-Mikroskop untersucht.

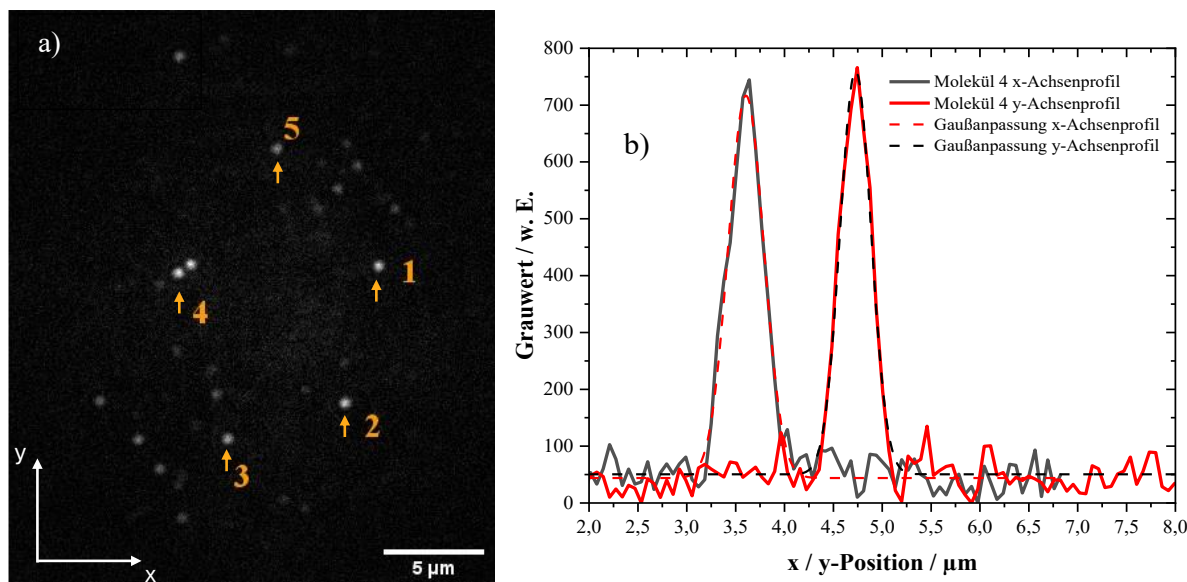


Abbildung 28: a) Aufnahme von Terrylen im o-TIRF mit Nummerierung der ausgewählten Moleküle zur Bestimmung der Halbwertsbreite. b) Gaußanpassung von Molekül Nr 4 in x- und y-Richtung. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ($P = 15 \text{ mW}$); $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}600 \text{ nm}$.

Der Mittelwert für die laterale Auflösung von fünf Molekülen aus Abbildung 28 liegt jeweils bei 410 nm und 383 nm in x- und y-Richtung und kann bei Betrachtung der Standardabweichungen als nahezu identisch angesehen werden. Die nach Gleichung (15) berechnete theoretische Auflösung liegt für Terrylen bei einem Emissionsmaximum von 575 nm und der verwendeten NA von 1.45 bei 242 nm. Die Unterschiede lassen sich in der Linienverbreiterung, spektraler Diffusion oder eventuell nicht-optimaler Fokussierung finden. Nach dem Nyquist Theorem sind mindestens zwei Pixel für die verlustfreie Aufnahme der Information nötig. Die Intensitätsverteilung eines einzelnen Moleküls sollte dafür mindestens über zwei Pixel abgebildet werden und die Pixelgröße der Kamera kleiner als die Hälfte des auflösbaren Abstands sein ^[45,228]. Mit einer tatsächlichen Pixelgröße von 65 nm wird dieses Kriterium erreicht und das Signal eines “Doughnuts” verteilt sich bei einer tatsächlichen Größe des beugungslimitierten Punkts von rund 0.7 µm auf etwa 10 Pixel in eine Richtung.

3 Ergebnisse & Diskussion

Tabelle 1: Erhaltene FWHM-Werte für Moleküle 1 bis 5 aus den Gaußanpassungen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW).

Molekül Nr.	FWHM / nm x-Achse	FWHM / nm y-Achse
1	425	377
2	391	374
3	412	400
4	429	372
5	393	392
MW ($\pm$ STABW)	410 $\pm$ 17	383 $\pm$ 12

Die Überlagerung mit Emissionsmustern aus dem System Terrylen/*p*-Terphenyl in Abbildung 29 zeigt, dass die laterale Auflösung ohne Kristallsystem eine gute Näherung ist. Erkennbar ist dabei auch die deutliche Abweichung von ca. 20% des tatsächlichen Maximums zu dem aus der versuchten Anpassung des „Doughnut“-Emissionsmusters. Mit konfokalen Methoden sind im gleichen System experimentelle Auflösungen im Bereich von 300 nm erreichbar [200].

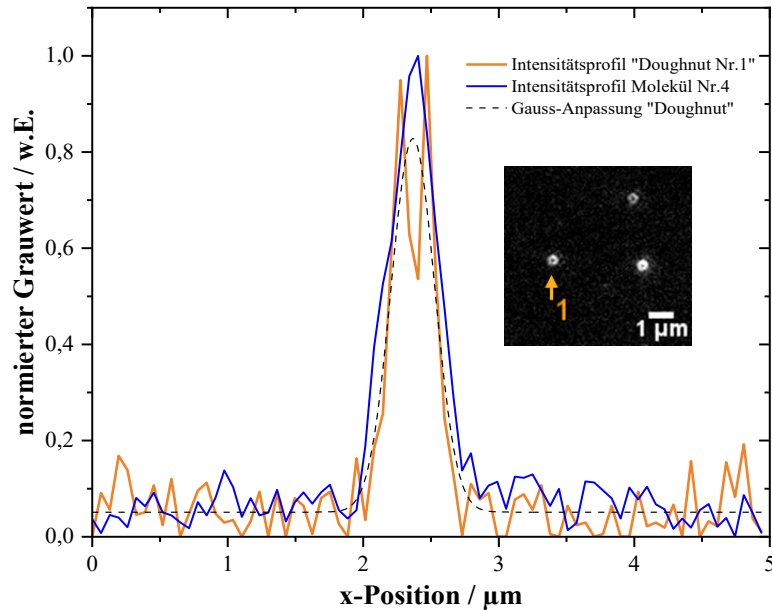


Abbildung 29: Vergleich des Intensitätsprofils von Terrylen in *p*-Terphenyl, dessen Gaußanpassung und dem Profil ohne *p*-Terphenyl. Die Anpassung ergibt eine FWHM des Emissionsmusters von 377 nm.

Zur Abschätzung der Detektionseffizienz bietet es sich an, die theoretisch emittierten mit den theoretisch und tatsächlich detektierten Photonen zu vergleichen. Tabelle 2 zeigt die nach Gleichung (4) ermittelten Anregungsraten für die Anregung mit 488 nm ($I = 0.94 \text{ kW/cm}^2$) sowie für die kombinierte Anregung mit 488/546 nm ($I = 1.25 \text{ kW/cm}^2$). Dabei wurde angenommen, dass das System bei den verwendeten, niedrigen Anregungsintensitäten nicht im Sättigungsbereich liegt und die Rate durch Kombination mit einer zweiten Laserlinie linear erhöht werden kann. Mithilfe der bekannten Quantenausbeute von Terrylen ($\Phi_{\text{Fl}} = 0.7$) ergibt sich die zu erwartende Emissionsrate k_{em} im Zwei-Niveau-System. Zum Vergleich mit den tatsächlich detektierten Photonen wurde der Mittelwert der detektierten Photonen für jeweils zehn Emissionsmuster bestimmt und daraus die Rate k_{real} berechnet.

Tabelle 2: Vergleich der berechneten Anregungsrate k_{12} , Emissionsrate k_{em} und tatsächlich detektierten Photonenrate k_{real} .

$\lambda_{exc} / \text{nm}$	$k_{12} / 10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{em} / 10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{real} / 10^4 \text{ s}^{-1}$	k_{real}/k_{em}
488	10.5	7.3	0.72 ± 0.23	0.10
488/546	21.3	14.9	3.54 ± 0.13	0.24

Aus dem Verhältnis k_{real}/k_{em} aus Tabelle 2 geht hervor, dass im Mittel zwischen 10 und 25% aller emittierten Photonen detektiert werden können. Anhand der großen Standardabweichungen ist erkennbar, dass einige Moleküle auch deutlich stärkere oder schwächere Signale zeigen. Abbildung 30 zeigt eine Aufnahme, deren Grauwert in Photonen umgerechnet wurde, sowie die daraus erhaltene Einzelmolekülspur. Das dargestellte Molekül emittiert 36.155 Photonen/s und somit rund 720.000 Photonen über einen Zeitraum von 20 s bis zum Eintreten von Photobleichen.

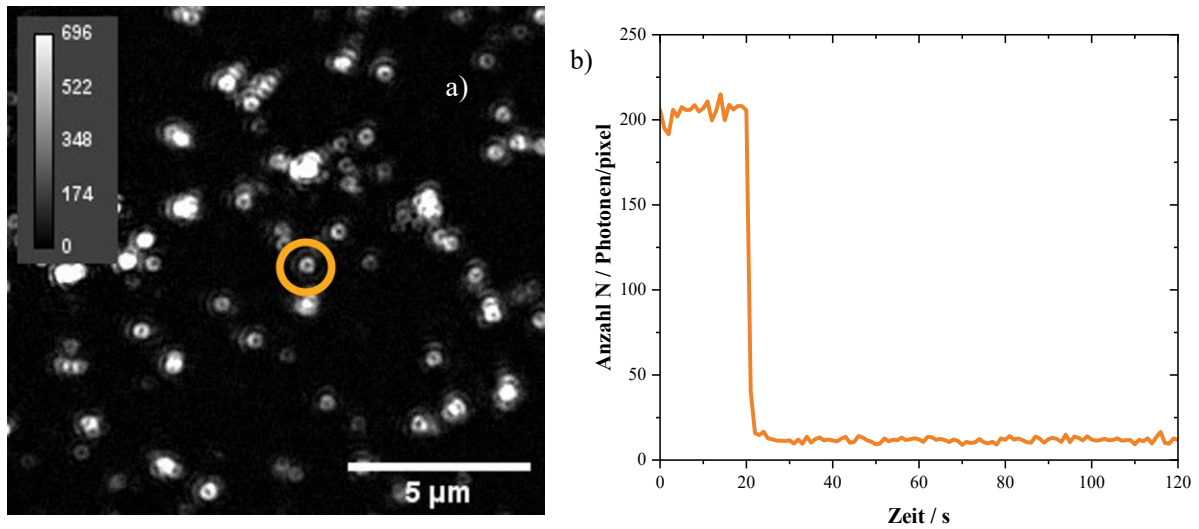


Abbildung 30: a) Aufnahme von Terrylen in *p*-Terphenyl mit 1 s Auflösung nach Umwandlung in Photonen pro Pixel. b) Dazugehörige Einzelmolekülzeitspur. Integration der ROI von 16x16 Pixel um das Molekül. $\lambda_{exc} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$); $\lambda_{det} = 555-625 \text{ nm}$; o-TIRF.

Zusätzlich lässt sich bestimmen, welcher Anteil an Photonen aus dem klassischen Modell des isotropen Emitters in Kombination mit Verlusten aus optischen Bauteilen theoretisch zu erwarten wäre. Näherungsweise wurde nach Gleichung (11) mit der NA des Ölimmersionsobjektivs (1.45) eine theoretische Einsammeleffizienz von 35% bestimmt. Zusätzliche Verluste durch optische Bauteile (drei Spiegel, zwei Linsen, zwei dichroitische Spiegel, zwei Emissionsfilter), in Kombination mit der Quanteneffizienz des Detektors im Bereich der Emission von Terrylen ($\sim 75\%$), reduzieren die Einsammeleffizienz auf rund 17.5%. Weitere Verluste werden durch die Grenzen des spezifischen Bandpassfilter verursacht, für die sich ein zusätzlicher Reduktionsfaktor für Terrylen und seine Photoprodukte berechnen lässt. Die Berechnung dieses Faktors erfolgte durch Integration und Bestimmung des Flächenverhältnisses des vom Filter abgedeckten Spektrums zum gesamten Spektrum. Die beste Überlappung zwischen Filter und Emissionsspektrum besteht mit 82% für den Bandpassfilter 590/70. Insgesamt reduziert sich die theoretische, effektive Detektionseffizienz k_{eff} bei Verwendung dieses Filters auf 14% von k_{em} .

Tabelle 3: Theoretisch detektierbare Photonenrate k_{eff} und tatsächlich detektierte Photonenrate k_{real} .

$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$k_{\text{eff}} / 10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{real}} / 10^4 \text{ s}^{-1}$
488	1.03	0.72 ± 0.23
488/546	2.09	3.54 ± 0.13

Die Mittelwerte der tatsächlich detektierten und theoretisch erwarteten Photonen aus Tabelle 3 liegen in der gleichen Größenordnung. Abweichungen zwischen k_{real} und k_{eff} sind einerseits mit der nicht vollständigen Entfernung des Untergrunds und Überlappung mit den Signalen angrenzender Pixel zu erklären. Andererseits spielt die Abstrahlcharakteristik an der Grenzfläche eine Rolle, die für die Abschätzung von k_{eff} vernachlässigt wurde und höhere Werte für k_{real} erklären kann. Durch die Orientierung der Dipole an der Grenzfläche werden, im Vergleich zu isotropen Emittlern, mehr Photonen in Richtung des Objektivs emittiert.

Zur Charakterisierung des Messaufbaus wurde auch das SNR bestimmt. Da dieses ebenfalls stark von den Anregungs- und Detektionsbedingungen abhängig ist, wurden analog zur Detektionseffizienz Messungen mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ sowie $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ und dem 590/70 Bandpassfilter analysiert. Einzelmolekülzeitspuren mit Bleichverhalten spiegeln dabei sowohl das Fluoreszenzsignal als auch das Verhalten des Untergrunds innerhalb der gleichen ROI (engl. *region of interest*) über einen längeren Zeitraum wider. Sie eignen sich damit besser zur Analyse als orts aufgelöste Intensitätssignale. Wegen der bereits erwähnten, unterschiedlichen Helligkeiten in den Proben, wurde der Mittelwert zehn verschiedener Zeitspuren gebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Das SNR liegt bei alleiniger Anregung mit 488 nm niedriger als bei Anregung mit beiden Wellenlängen. Grund ist die niedrigere Anregungsintensität. Die Schwankungen der Helligkeiten zwischen einzelnen Terrylenmolekülen sind als Ursache für die hohen Standardabweichungen zu nennen. Insgesamt zeichnen sich die erhaltenen Signale aber durch ein hohes SNR aus.

Tabelle 4: Signal-zu-Rauschen-Verhältnis für Terrylen im o-TIRF, abhängig von der Anregungswellenlänge.

$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	SNR	Standardabweichung
488	24.0	± 11.1
488/546	31.9	± 7.4

3.1.4 Überlegungen zur Detektion der Photooxidation auf dem Einzelmolekülniveau

Für den klassischen TIRF-Aufbau, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, beruht die Detektion verschiedener Photoprodukte mit Flächendetektoren auf dem Einsatz der passenden Detektionskanäle und Emissionsfilter. Stattdessen werden klassischerweise Wellenlängenbereiche detektiert, die durch die Auswahl der Filter vorgegeben sind. Die Aufnahme eines kompletten Spektrums war mit TIRF nicht ohne weitere Modifikation des Aufbaus möglich. Aus den Experimenten von Basché und Christ ist bekannt, dass sich die Form der Emissionsspektren der Photoprodukte nicht wesentlich von Terrylen unterscheidet und das Maximum des Hauptprodukts um 40 nm hypsochrom verschoben ist ^[37].

Zur Abschätzung der Detektionseffizienz von Terrylen und seinen Photoprodukten wurden daher die Ensemblespektren von Terrylen um 13 nm korrigiert, um die Einbettung im Kristall zu berücksichtigen. Hypothetische Produktspektren wurden durch Verschiebung der Ensemblespektren um weitere 40 nm generiert. Zusätzliche Produktspektren mit 70 nm und 100 nm-Verschiebung wurden generiert, um die Spektren der zweithäufigsten Produktfraktion sowie des Exoperoxids zu simulieren und diskutieren. Die Stokes-Verschiebung in kristallinem *p*-Terphenyl beträgt bei Raumtemperatur 1.6 nm^[200] und wurde zur Korrektur der Absorptionsspektren relativ zur Emission verwendet. Anhand der Spektren wurden Filter und Laser so ausgewählt, dass die verschiedenen Spezies möglichst selektiv in Farbkanälen detektiert werden konnten (siehe Kapitel 4 für eine detaillierte Darstellung der Filterspektren). Eine Übersicht der verwendeten Farbkanäle für eine Anregung mit 488 nm ist in Abbildung 31 gezeigt. Im langwelligeren, „grünen“ Detektionskanal wurde demnach hauptsächlich die Fluoreszenz von Terrylen detektiert, aber auch Anteile der Spektren der vermuteten Photooxidationsprodukte. Im kurzwelligen, „blauen“ Detektionskanal wurde dagegen ausschließlich die Fluoreszenz der vermuteten Zersetzungsprodukte detektiert. Experimentell ließ sich dieser Umstand dazu nutzen, die Signale des Zielmoleküls von angrenzenden Molekülen klar abtrennen zu können. Nach Durchlaufen von Zustandsänderungen konnten die Signale in beiden Detektionskanälen durch Kalibrierung der horizontalen und vertikalen Achse, wie in Abbildung 33 gezeigt, eindeutig zugeordnet werden. Mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm konnte Terrylen wegen der geringen Extinktion von 0.1 nur wenig effektiv angeregt werden. Die Extinktionen des hypothetischen Diepoxids und 70 nm verschobenen Produkts liegen mit rund 0.35 deutlich höher.

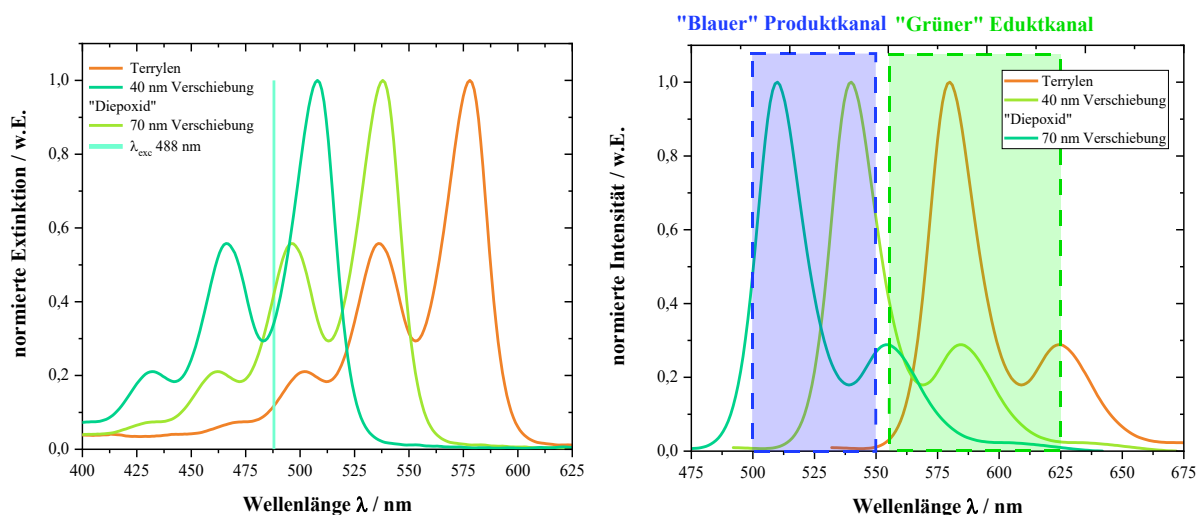


Abbildung 31: Zusammenfassung der korrigierten Absorptions- und Emissionsspektren von Terrylen und den daraus generierten Produktspektren relativ zur Lage der Detektionskanäle in Pseudofarben bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm.

3 Ergebnisse & Diskussion

Um die Ausbeute an bleichenden Molekülen zu maximieren und unterschiedliche Anregungs- und Detektionsbedingungen abzudecken, wurden zusätzliche Experimente durch Zuschalten einer Anregungswellenlänge von 546 nm durchgeführt. Dabei wurde der Filter im blauen Produktkanal angepasst. Durch die verschobene Anordnung von Emissionsfilter und dichroitischem Spiegel im blauen Kanal (Abbildung 32) war hier ein größerer Anteil der um etwa 70 nm verschobenen Produktfraktion zu erwarten.

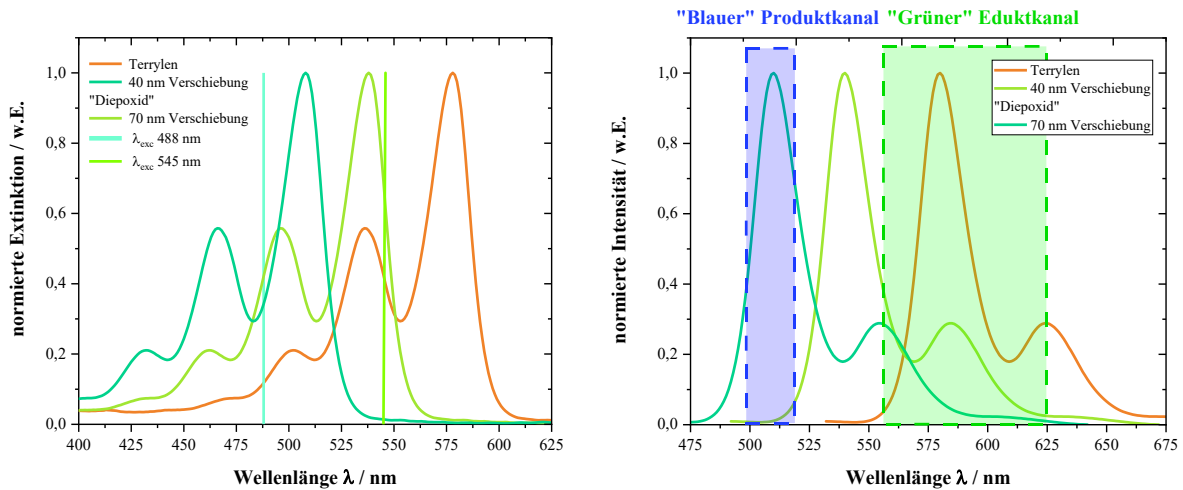


Abbildung 32: Zusammenfassung der korrigierten Absorptions- und Emissionsspektren von Terrylen und den daraus generierten Produktspektren relativ zur Lage der Detektionskanäle in Pseudofarben. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546$ nm.

Analog zu den Überlegungen zur Einsammeleffizienz, lässt sich der Anteil der Fläche des Emissionsspektrums innerhalb der Filter an der Gesamtfläche bilden. Die durch Integration der Peakflächen enthaltenen Werte sind in Tabelle 5 gezeigt. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die Überlegungen auf idealisierten Spektren, unter Vernachlässigung des Einzelmolekülcharakters, spektralen Schwankungen sowie der Annahme idealer Filtergrenzen beruhen. Die erhaltenen Werte stellen daher eine grobe Abschätzung der Spektrenanteile dar.

Tabelle 5: Anteile der Emissionsspektren in Detektionskanälen als Verhältnis der durch Filter abgedeckten Fläche zur Gesamtpeakfläche von 35.1.

Spezies	Peakfläche im blauen Kanal / w.E.	Relativer Anteil im blauen Kanal	Peakfläche im grünen Kanal / w.E.	Relativer Anteil im grünen Kanal
$\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm				
Terrylen	0	0 %	28.9	82 %
40 nm Verschiebung	19.4	55 %	15.2	43 %
70 nm Verschiebung	25.2	72 %	7.1	20 %
$\lambda_{\text{exc}} = 488/546$ nm				
Terrylen	0	0 %	28.9	82 %
40 nm Verschiebung	0.6	2 %	15.2	43 %
70 nm Verschiebung	14.4	41 %	7.1	20 %

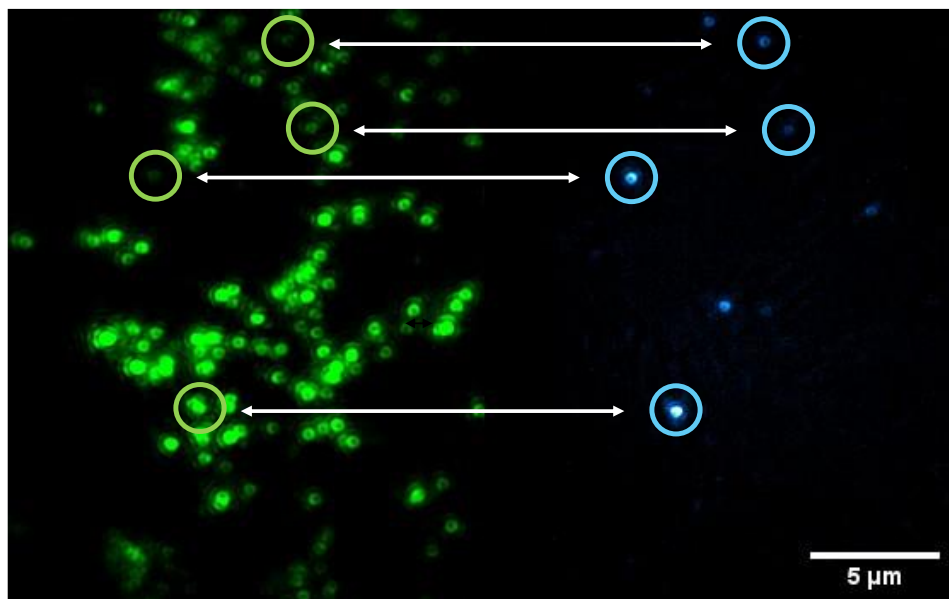


Abbildung 33: Aufnahme von Terrylen in *p*-Terphenyl in beiden Detektionskanälen in Pseudofarben. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$, ($P = 15/5 \text{ mW}$). Gemittelte Intensität über 50 Aufnahmen mit 0.3 s Belichtungszeit. Farbcodierung mit Pseudofarben.

Abbildung 34 zeigt die Lage der elektronischen Spektren des hypothetischen Exoperoxids, dessen Absorptionsmaximum, theoretischen Rechnungen nach ^[37], um 100 nm hypsochrom verschoben liegt. Entgegen den vorausgehenden Studien und Annahmen aus der Literatur, sollte für das theoretisch verschobene Absorptionsspektrum eine Anregung mit 488 nm in der rechten Flanke des Absorptionsspektrums möglich sein. Das Emissionsspektrum läge ebenfalls mit geringen Anteilen im blauen Produktkanal. Zusätzliche Messungen mit den entsprechenden Wellenlängen wären hilfreich für den Nachweis des Exoperoxids und wurden daher explorativ mit 405 nm durchgeführt.

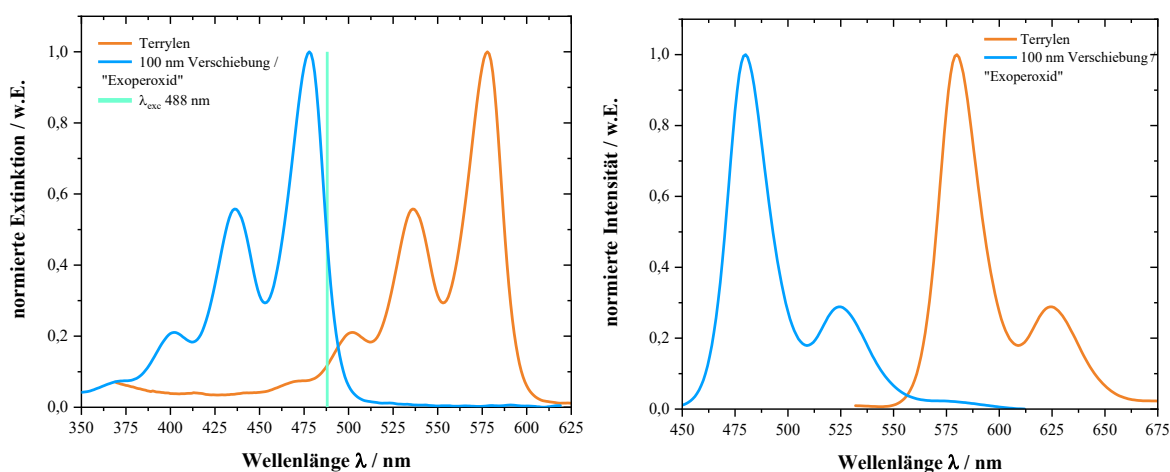


Abbildung 34: Zusammenfassung der korrigierten elektronischen Spektren von Terrylen und dem hypothetischen Exoperoxid mit 100 nm Verschiebung.

3.1.5 Untersuchung der Photooxidation mittels o-TIRF-Mikroskopie

Mithilfe der optimierten Spincoating Methode konnten Proben mit einer moderaten Belegungsdichte erhalten werden, die mit den vorgestellten Detektionsbedingungen in zwei Farbkanälen untersucht werden konnten. Der Bildausschnitt wurde dabei auf circa 2000x400 Pixel beschränkt, um die Verarbeitung der Datenmenge bezüglich benötigter Speicher- und Rechenleistung möglich zu machen. Damit konnten pro Aufnahme mehrere hundert Moleküle im grünen Kanal detektiert werden. Im blauen Kanal konnte für beide Anregungsbedingungen eine Ausbeute von Photooxidationsprodukten im niedrigen zweistelligen Bereich detektiert werden. Eine Übersicht der abgebildeten ROI mit einer beispielhaften Bestimmung der Anzahl der detektierten Signale zeigt Abbildung 35.

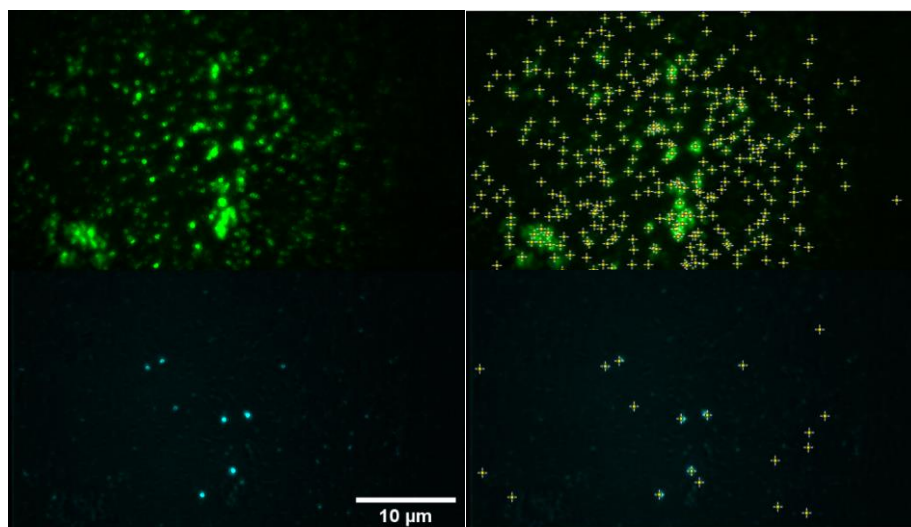


Abbildung 35: Links: Aufnahme von Terrylen in *p*-Terphenyl in zwei Farbkanälen, gemittelt über 100 Einzelbilder. Rechts: Markierung der Intensitätsmaxima mit ImageJ. 339 Signale im grünen Kanal. 19 Signale im blauen Kanal. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ($P = 15 \text{ mW}$); $\lambda_{\text{det, grün}} = 555\text{-}625 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{det, blau}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$; o-TIRF.

Innerhalb der ersten Minuten nach Anschalten der Anregungsquellen konnte für rund 60% der sichtbaren Terrylenmoleküle auf der ausgeleuchteten Fläche Bleichverhalten festgestellt werden. Die verbleibende Fraktion an Molekülen zeigte nur noch vereinzelt Bleichen und war auf einer längeren Zeitskala mit konstantem Emissionsniveau stabil. Dieser Eindruck konnte durch die Aufnahme der Gesamthelligkeit der ROI bestätigt werden und deckt sich mit den Beobachtungen aus der Literatur^[130], wie in Abbildung 36 gezeigt. Eine Anpassung der Intensitätskurve konvergierte bei Verwendung einer bi-exponentiellen Funktion, wobei bei Anregung mit 488 nm (0.94 kW/cm^2) eine schnelle Zeitkonstante von $9.2 \pm 0.3 \text{ s}$ sowie eine langsame Zeitkomponente von $84 \pm 3 \text{ s}$ erhalten wurde. Bei Anregung mit den kombinierten Wellenlängen 488 nm/546 nm (1.25 kW/cm^2) betrugen die Bleichzeiten $11.2 \pm 0.6 \text{ s}$ und $73.1 \pm 6.5 \text{ s}$. Mögliche Gründe für die hohe Stabilität der stabileren Fraktion sind der Einbau in größere Kristalle oder eine tiefere Einbettung im Kristall, womit eine geringe Erreichbarkeit durch Sauerstoff zu erwarten wäre.

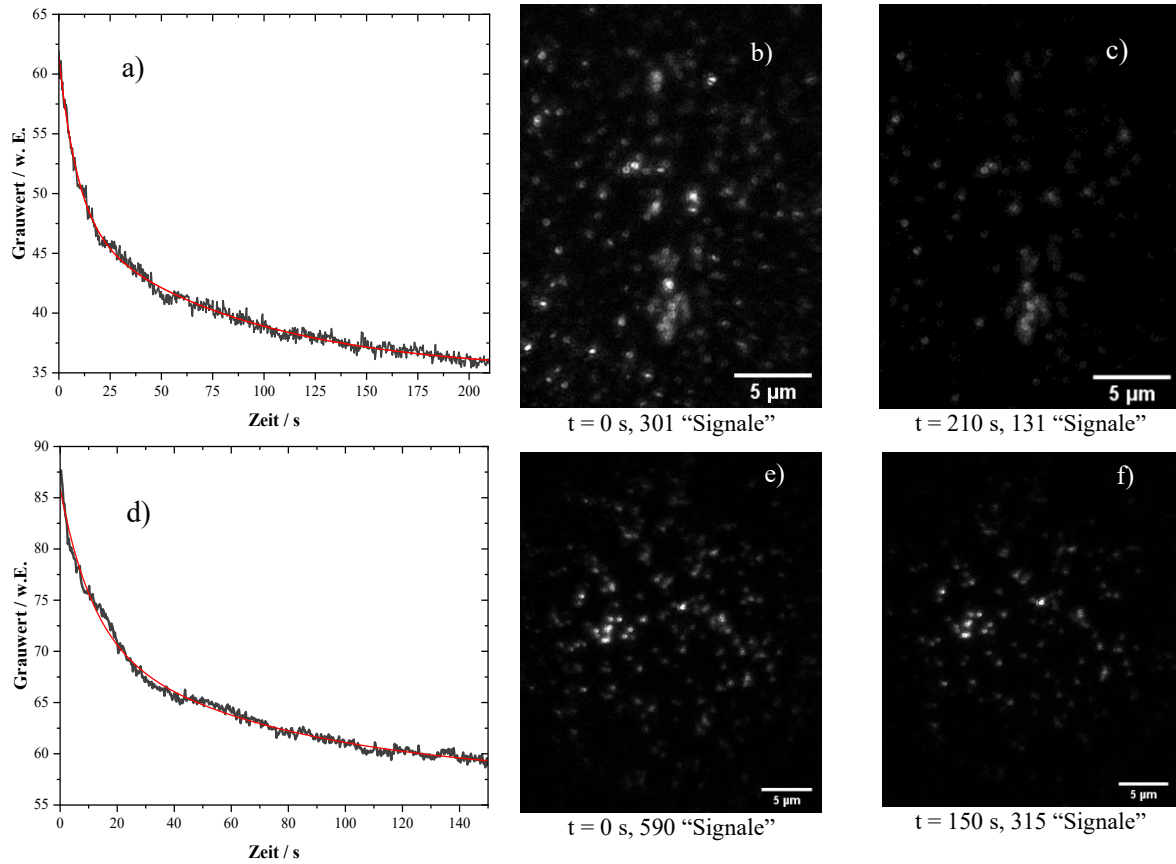


Abbildung 36: a)d) Verlauf der Intensität über den gesamten Detektionsbereich einer Aufnahme von Terrylen in *p*-Terphenyl mit bi-exponentieller Anpassung in Rot. b)e) Einzelaufnahme zu Beginn der Messung und c)f) am Ende der Messung mit Anzahl der Emissionsmaxima. a-c: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $P = 15 \text{ mW}$, $\lambda_{\text{det}} = 555\text{-}625 \text{ nm}$. d-f: $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$), $\lambda_{\text{det}} = 555\text{-}625 \text{ nm}$; o-TIRF.

Bei Betrachtung einzelner Molekülsignale zeigten etwa 10% der bleichenden Moleküle Intensitätsänderungen, die TSPB zugeschrieben werden konnten. Dies äußerte sich darin, dass sich die Signalstärke im grünen Detektionskanal signifikant veränderte und zusätzlich im blauen Detektionskanal detektiert wurde. In der Bildsequenz aus Abbildung 37 ist dieses Verhalten exemplarisch für ein Terrylenmolekül mit Emissionsmuster aufgeführt.

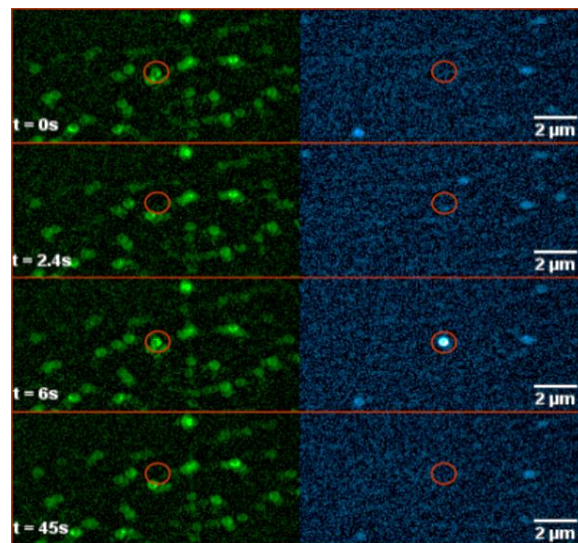


Abbildung 37: Aufnahme von Terrylen zu charakteristischen Zeiten für TSPB. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$).

90% der Moleküle zeigen Verhalten, das OSPB zugeschrieben werden konnte. Vereinzelt konnten auch irreguläre Intensitäts- und Emissionsfluktuationen detektiert werden, die keinem der Prozesse zugeordnet werden konnten und von der Analyse ausgeschlossen wurden (siehe Anhang, Kapitel 7.1.2). Eine Auswahl von Einzelmolekülspektren zeigt die unterschiedlichen detektierten Verhaltensweisen in Abbildung 38. Für einen Auszug weiterer Spuren wird ebenfalls auf Kapitel 7.1.2 verwiesen.

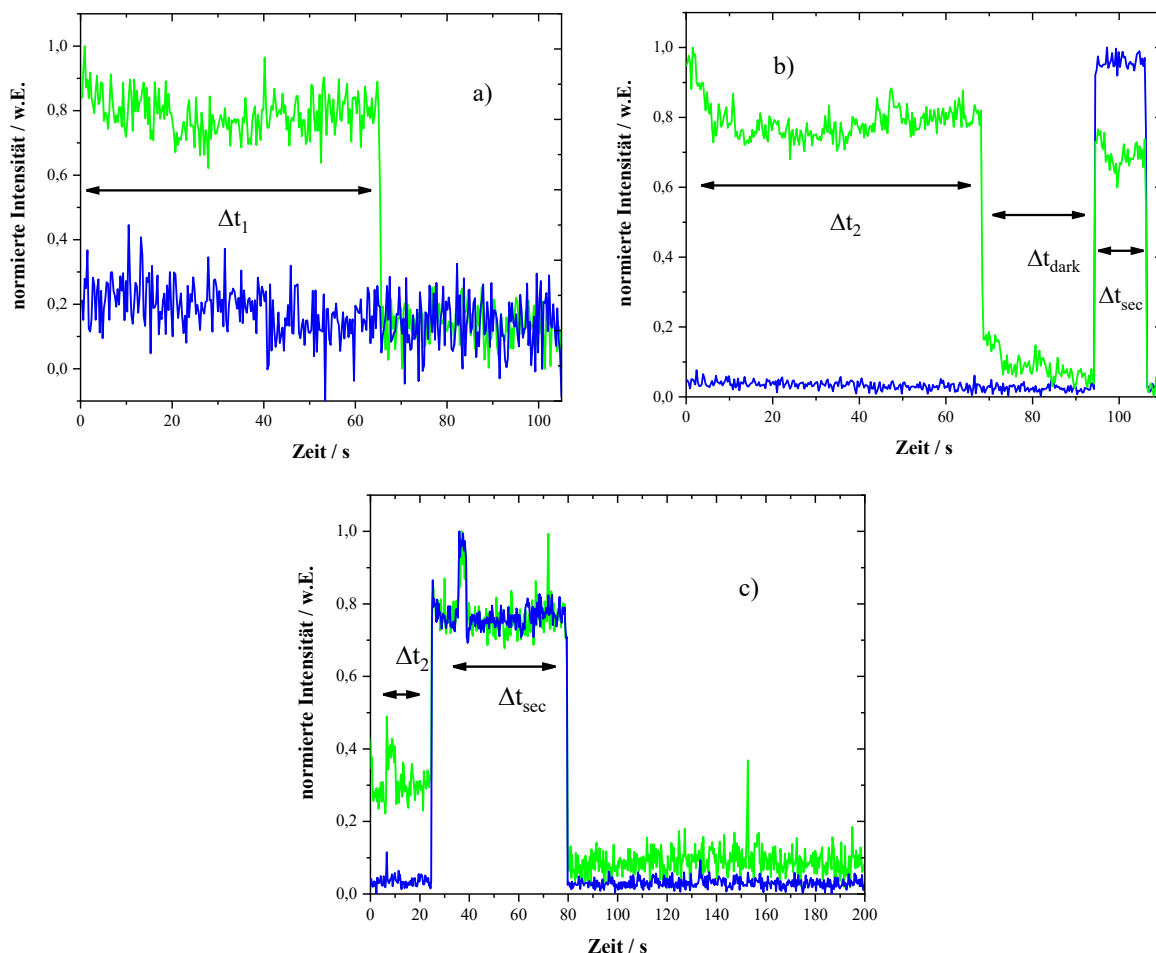


Abbildung 38: Beispielspektren für **a)** OSPB, **b)** TSPB mit einem deutlichen Dunkelzustand und **c)** TSPB ohne ersichtlichen Dunkelzustand. Δt_1 , Δt_2 , Δt_{dark} und Δt_{sec} bezeichnet jeweils die Verweildauer des Moleküls in unterschiedlichen Zuständen. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$).

Abbildung 38a zeigt die typische Zeitspur eines Zielmoleküls mit OSPB, dessen Emission nach 65 s irreversibel auf das Niveau des Untergrunds einbricht, ohne korrespondierendes Produktsignal im blauen Kanal. Abbildung 38b zeigt ein Beispiel für TSPB mit intermediärem Dunkelzustand. Das Signal bricht nach 70 s für eine Dauer von 20 s ein, bevor die Fluoreszenz des gleichen Moleküls in beiden Farbkanälen mit unterschiedlicher Helligkeit wieder auftaucht. Nach weiteren 10 s bricht das Signal in beiden Kanälen irreversibel ein. Für TSPB wurden sowohl Spuren mit höherer als auch niedrigerer Helligkeit nach einem Intensitätssprung detektiert. Es wurde eine auffällig hohe Anzahl an instantanen Umsetzungen beobachtet, bei denen kein zwischenzeitlicher Dunkelzustand auftauchte. Dabei veränderte sich die Zählrate des Moleküls instantan im grünen Kanal und erschien zeitgleich im blauen Detektionskanal, wie in Abbildung 38c nach 25 s dargestellt.

3 Ergebnisse & Diskussion

Für die Untersuchung der Photooxidation konnten bei Anregung mit 488/546 nm ($I = 1.25 \text{ kW/cm}^2$) Zeitspuren von 520 Terrylenmolekülen mit unterschiedlichem Verhalten aus 40 Aufnahmen mit einer Zeitauflösung von 0.3 s aufgenommen und analysiert werden. Mit der gleichen Zeitauflösung konnten für die Untersuchung mit 488 nm ($I = 0.94 \text{ kW/cm}^2$) aus 30 Aufnahmen 293 Molekülspuren analysiert werden. Mit dem entwickelten Set-Up war es möglich, für jeden Schritt im aufgestellten Reaktionsschema (Abbildung 16) eine charakteristische Bleichzeit durch Auftragung der Zeiten Δt_1 , Δt_2 , Δt_{dark} und Δt_{sec} in Histogrammen und deren Anpassung zu ermitteln (Abbildung 39 und Abbildung 40). τ_1 stellt die charakteristische Bleichzeit für OSPB dar, während τ_2 die Bleichzeit bis zur ersten Intensitätsänderung im TSPB beschreibt. Die nachfolgende Zeit, die das Molekül im Dunkelizustand verbleibt, wird mit τ_{dark} bezeichnet. Moleküle ohne erkennbaren Dunkelizustand wurden in den ersten Container mit $\Delta t = 0-0.3 \text{ s}$ aufgenommen. Der letzte Schritt im TSPB wird mit τ_{sec} bezeichnet und umfasst den irreversiblen, sekundären Bleichschritt nach Durchlaufen eines vorherigen Intensitätssprungs oder Dunkelizustands. Neben der exponentiellen Anpassung der Histogramme wurden zum Vergleich auch die Mittelwerte der Bleichzeiten gebildet und zusammenfassend in Tabelle 6 dargestellt. Die charakteristischen Bleichzeiten wurden jeweils für die in den Abbildungen angegebene Anzahl an Molekülen, aufgetrennt nach der Anregungsintensität, bestimmt. Nicht für alle Moleküle, die Intensitätssprünge zeigen, konnte bis zum Ende des Beobachtungsfenster sekundäres Photobleichen beobachtet werden. Ebenso machten Überlagerungen mit anderen Molekülsignalen eine Zuordnung teilweise schwierig, weshalb auftauchenden Molekülen im grünen Kanal zwar Δt_{sec} , nicht aber Δt_2 zugeordnet werden konnte. Daher unterscheidet sich die berichtete Anzahl der konsekutiven Reaktionsschritte τ_2 , τ_{dark} und τ_{sec} .

Tabelle 6: Zusammenfassung der charakteristischen Bleichzeiten aus Abb. 39 und 40.

Reaktionsschritt	Anzahl der Moleküle	Charakteristische Bleichzeit / s (exponentielle Anpassung)	Charakteristische Bleichzeit / s (Mittelwert)
Abbildung 39		$\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$	
a) τ_1	264	14.0 ± 1.0	23.2 ± 26.0
b) τ_2	135	22.2 ± 2.5	32.6 ± 35.3
c) τ_{dark}	216	n.a.	14.3 ± 22.4
d) τ_{sec}	256	2.4 ± 0.1	10.2 ± 16.4
Abbildung 40		$\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$	
a) τ_1	206	27.0 ± 2.9	35.9 ± 35.4
b) τ_2	49	35.7 ± 5.4	34.6 ± 35.9
c) τ_{dark}	64	n.a.	5.4 ± 13.5
d) τ_{sec}	87	8.8 ± 0.8	15.9 ± 24.1

3 Ergebnisse & Diskussion

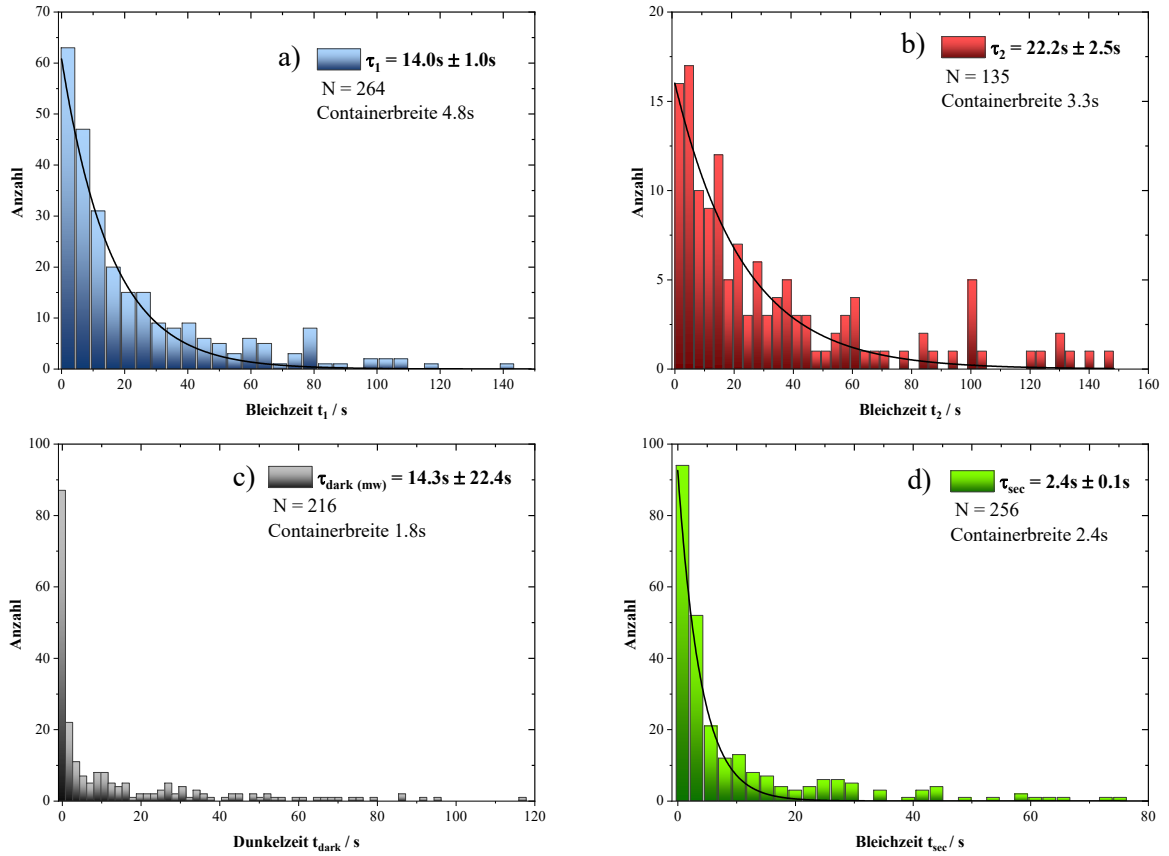


Abbildung 39: a-d) Histogramme und monoexponentielle Anpassungen bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546$ nm. Zur besseren Erkennbarkeit wurden Container >0.3 s verwendet. Rohdaten siehe Anhang.

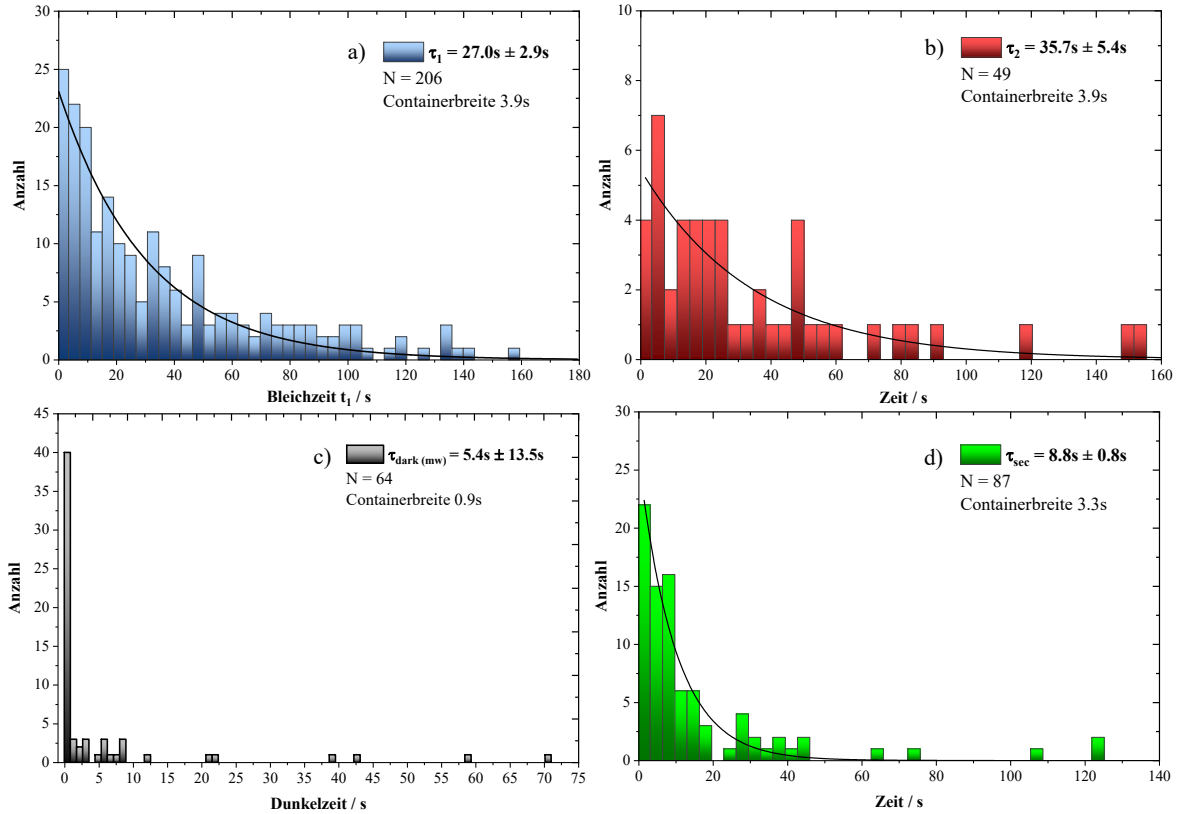


Abbildung 40: a-d) Histogramme und monoexponentielle Anpassungen bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm. Zur besseren Erkennbarkeit wurden Container >0.3 s verwendet. Rohdaten siehe Anhang.

Die erhaltenen Mittelwerte sind mit relativen Standardabweichungen von über 100% deutlich fehlerbehaftet und können die charakteristische Bleichzeit und Ratenkonstante nur unzureichend genau erfassen. Stattdessen stützt sich die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse auf die exponentiellen Anpassungen. Bei Verwendung der 488 nm Anregungsquelle und niedrigerer Anregungsintensität konnten, wegen des geringeren SNR und der geringeren Anzahl an detektierten Photonen, insgesamt weniger Spuren erkannt werden. Daher wurden hier höhere Fehlerwerte aus den exponentiellen Anpassungen erhalten. Die für τ_1 und τ_2 erhaltenen Werte liegen innerhalb der jeweiligen Anregungsintensität in einem ähnlichen Bereich und deuten darauf hin, dass die beiden Reaktionsschritte ähnlich schnell ablaufen. τ_{sec} ist im Vergleich um eine Größenordnung kleiner und impliziert, dass die Reaktion mit einem zweiten Sauerstoffmolekül schneller abläuft, vermutlich bedingt durch die bessere Anregbarkeit des blauverschobenen Photooxidationsprodukts. Als Maß für die Effizienz der Photooxidation lässt sich das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_R zur Anregungsrate k_{12} heranziehen. Die erhaltene Quantenausbeute der Reaktion gibt den Anteil der angeregten Moleküle wieder, die oxidiert werden und berechnet sich aus:

$$\Phi_R = \frac{k_R}{k_{12}} = \frac{1}{\tau_R * k_{12}} \quad (26)$$

Sie lässt sich somit für die primären Photooxidationsschritte aus τ_1 (OSPB) und τ_2 (TSPB) bestimmen und liefert die in Tabelle 7 gezeigten Werte. Sie liegen im Bereich von zuvor veröffentlichten Studien^[80] und zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Anregungsintensitäten. Ein Hinweis darauf, dass sich der Reaktionsmechanismus zwischen den Bedingungen nicht unterscheidet.

Tabelle 7: Quantenausbeute der Photooxidationsschritte τ_1 und τ_2 .

OSPB	$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$k_{12} / 10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_R = 1/\tau_1 / \text{s}^{-1}$	$\Phi_R / 10^{-7}$
	488	10.5	0.037	3.5
	488/546	21.3	0.071	3.3
TSPB	$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$k_{12} / 10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_R = 1/\tau_2 / \text{s}^{-1}$	$\Phi_R / 10^{-7}$
	488	10.5	0.028	2.6
	488/546	21.3	0.045	2.1

Die charakteristische Bleichzeit der Moleküle zeigte eine zu erwartende Abhängigkeit von der Anregungsintensität, wie beim Vergleich der Werte von τ_1 , τ_2 und τ_{sec} zwischen Abbildung 39 und Abbildung 40 deutlich wird. Auffällig ist in Abbildung 39c und Abbildung 40c der hohe Anteil von 35%, respektive 53%, direkten Umsetzungen. Für 76 von 216 Spuren bei Anregung mit $I = 1.25 \text{ kW/cm}^2$ und 34 von 64 Spuren bei Anregung mit $I = 0.94 \text{ kW/cm}^2$ trat kein detektierbarer Dunkelzustand auf. Die Lebenszeit dieser Dunkelzustände könnte unterhalb der gewählten Zeitauflösung von 0.3s liegen. Eine alternative Erklärung, die auch durch die nicht-realisierte monoexponentielle Anpassung unterstützt wird, ist die Überlagerung zweier konkurrierender Prozesse. Es ist zu vermuten, dass sich deren Reaktionsgeschwindigkeiten maßgeblich unterscheiden und die Summe der Prozesse detektiert wird.

Eine Anpassung mit bi-exponentiellen Funktionen konvergierte für die Anregung mit $I = 1.25 \text{ kW/cm}^2$ mit akzeptablen Fehlerwerten, wie Abbildung 41 zu entnehmen. Dabei wurde eine schnelle Zeitkomponente, bezeichnet mit $\tau_{\text{direkt},1}$, erhalten, die mit $0.37 \text{ s} \pm 0.02 \text{ s}$ im Bereich des zeitlichen Auflösungsvermögens von 0.3 s liegt. Die langsamere Komponente, $\tau_{\text{dark},2}$, beträgt $11.90 \text{ s} \pm 1.61 \text{ s}$. Die Interpretation dieser Beobachtungen ist an dieser Stelle nur spekulativ möglich.

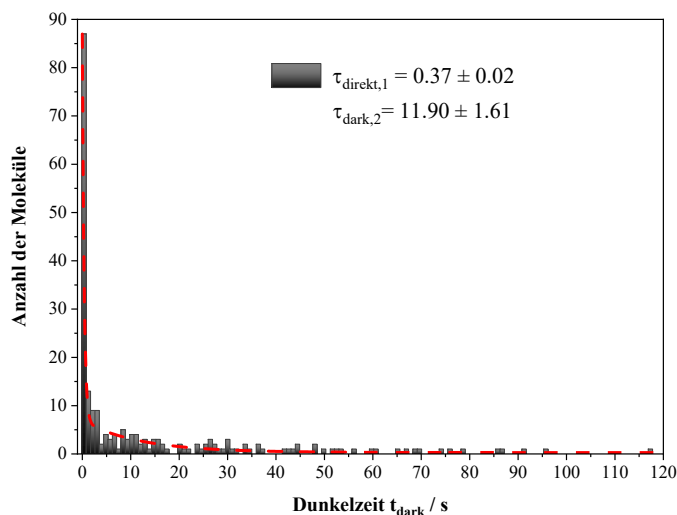


Abbildung 41: Dunkelzustandszeiten aus Abbildung 39c. Anpassung mit $y = y_0 + A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + A_2 \cdot \exp(-x/t_2)$ in Rot.

Der schnellere Prozess könnte als direkte Umsetzung zum fluoreszierenden Photoprodukt, wahrscheinlich dem Terrylendiepoxid, gedeutet werden. Theoretisch denkbar wäre diese direkte Entstehung des Diepoxids über einen alternativen Reaktionsweg mit Singulett-Sauerstoff. Etablierte, theoretische Rechnungen für eine Reihe von Acenen halten dieses Verhalten für die Bildung des Endoperoxids für plausibel [199,229]. Insgesamt lassen sich zwei unterschiedliche Arbeitshypothesen formulieren, die in den gezeigten Abbildungen beschrieben werden:

- (1) Es existiert ein zusätzlicher, vermutlich konzertierter Mechanismus, der vom Terrylen ohne Auftreten einer Zwischenstufe bis zum Diepoxid führt.

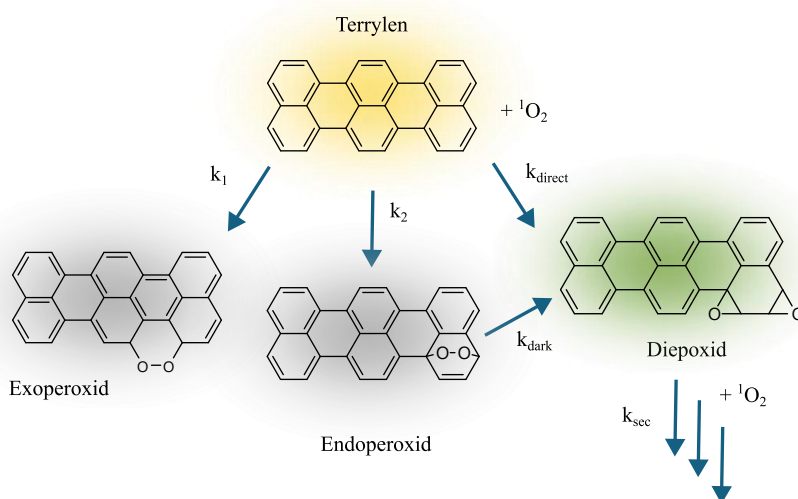


Abbildung 42: Vorgeschlagene Reaktionsschritte für Hypothese (1), direkter Weg zum Diepoxid.

- (2) Es existieren zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen, die über das Endoperoxid zum Diepoxid führen. Die Zeitkonstanten dieser Pfade unterscheiden sich wesentlich voneinander und könnten aus einem konzertierten (k_{direkt}) und einem schrittweisen Mechanismus (k_{dark}) bestehen.

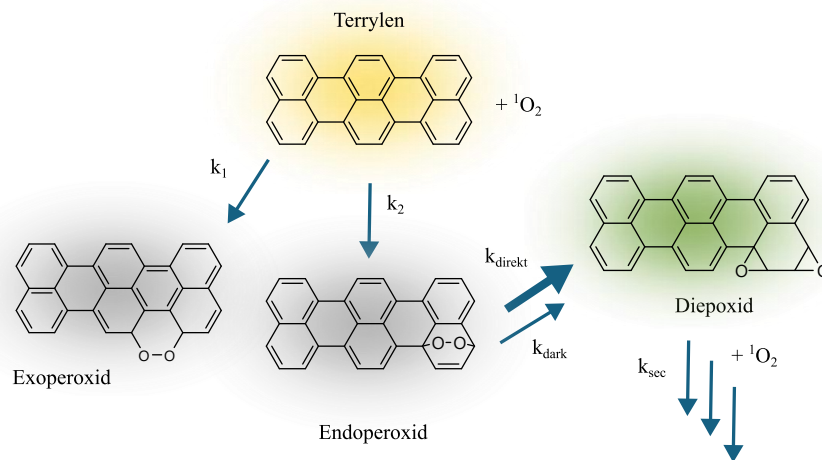


Abbildung 43: Vorgeschlagene Reaktionsschritte für Hypothese (2).

Eine Beteiligung von Triplett-Sauerstoff an diesen Reaktionspfaden zum Diepoxid kann eher ausgeschlossen werden. Hauptargumente sind die kinetisch unreaktivere Natur und die Neigung, Radikalreaktionen statt Additionsreaktionen zu bevorzugen^[230]. Zusätzliche Messungen wurden im Zuge einer Vertiefungsarbeit in Kooperation mit J. Berger^[231] mit einer höheren Anregungsintensität von 2 kW/cm^2 mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ am gleichen Aufbau durchgeführt. Damit konnten die Zeitspuren auch bei einer maximalen Zeitauflösung von 5 ms noch mit ausreichender Signalstärke aufgenommen werden. Ziel der Experimente war eine genauere Untersuchung der instantanen Umsetzungen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob diese auch bei höherer Zeitauflösung noch auftreten. Die Ergebnisse der Studien fasst die folgende Abbildung zusammen. Da auch mit multiexponentiellen Funktionen keine konvergierende Anpassung gefunden wurde, wurde der Mittelwert der Zeiten von $8 \text{ s} \pm 11 \text{ s}$ gebildet.

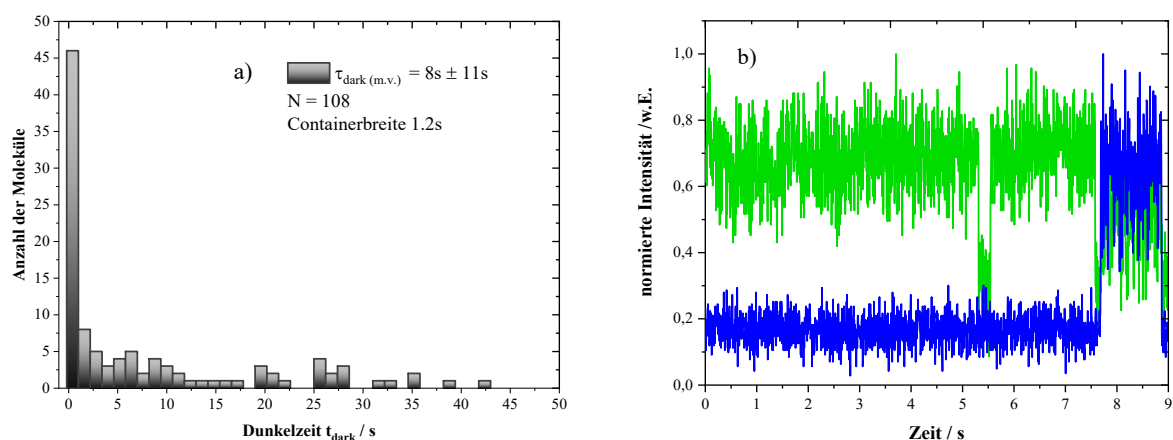


Abbildung 44: a) Histogramm der Dunkelzeiten aus Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $I = 2 \text{ kW/cm}^2$. Containerbreite 1.2 s . b) Einzelmolekülspur mit 5 ms Zeitauflösung mit kurzem Dunkelzustand (Dauer 15 ms) vor einem Intensitätssprung.

Auch mit einer höheren zeitlichen Auflösung wurde ein hoher Anteil an instantanen Umsetzungen beobachtet, was die Vermutung eines überlagerten Prozesses mit zwei unterschiedlichen Zeitkonstanten bekräftigte. Allerdings reduzierte sich mit 30 von 108 Spuren der Anteil von Spuren ohne detektierbaren Dunkelzustand. Aufgetrennt nach den verwendeten Anregungsintensitäten der Experimente ergibt sich die in Abbildung 45 gezeigte Auftragung des Anteils an instantanen Umsetzungen. Hohe Anregungsintensitäten korrelieren demnach mit einem kleineren Anteil an Umsetzungen ohne Dunkelzustand. In der ursprünglichen Literatur ^[37,200] wurden keine Umsetzungen ohne Dunkelzustand berichtet. Dabei wurde eine Anregungsintensität von 26.5 kW/cm^2 mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ verwendet. Vergleichswerte für die hier vorgestellten Zeitkonstanten τ_{dark} und τ_{sec} sind nicht literaturbekannt. Intensitätsabhängige Messungen wurden von T. Christ mit 2.65 kW/cm^2 und 440 kW/cm^2 im konfokalen Mikroskop durchgeführt. Dabei wurde lediglich die Reduktion der Bleichzeit durch Erhöhung der Intensität beobachtet, aber keine Beobachtungen zur mittleren Überlebenszeit der Dunkelzustände berichtet ^[200]. Insgesamt sind diese Ergebnisse als starker Hinweis auf das Auftreten eines bisher unentdeckten Reaktionsschritts zu deuten.

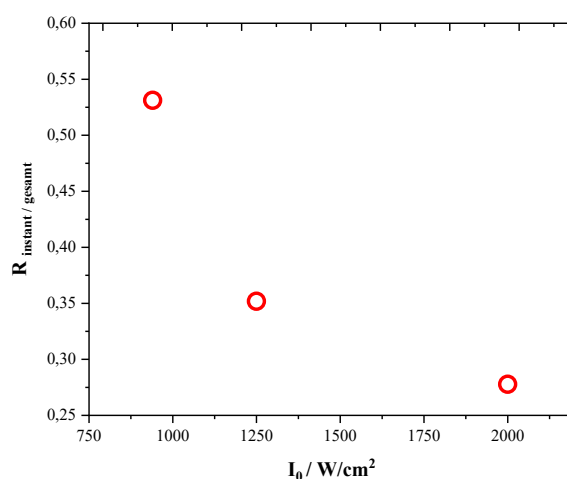


Abbildung 45: Anteil der instantanen Umsetzungen an der Gesamtzahl der Dunkelzeiten in Abhängigkeit der verwendeten Anregungsintensitäten.

3.1.6 Untersuchungen zur spektralen Zuordnung der Photoprodukte

Da die spektrale Lage der Photoprodukte durch die Detektion in Farbkanälen nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurden zusätzlich Einzelmolekülspektren aufgenommen. Durch Modifizierung des Aufbaus mithilfe eines Transmissionsgitters konnten bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ Einzelmolekülspektren oberhalb von 500 nm aufgenommen werden. Dabei wurde der Kamerasensor, statt in Farbkanäle, in einen räumlichen und einen spektralen Bereich getrennt (Abbildung 46), angelehnt an ähnliche Aufbauten aus der Literatur ^[48,49].

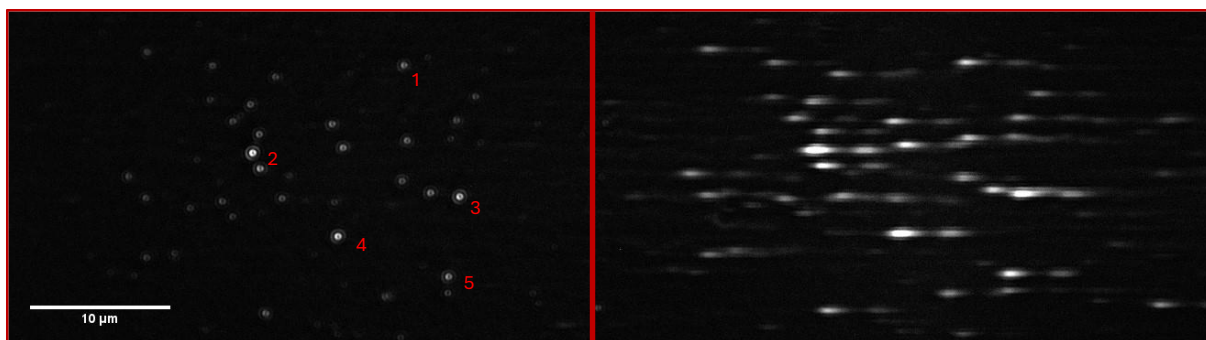


Abbildung 46: Gemittelte Aufnahme über 50 s im spektralen o-TIRF. Nullte Ordnung des Transmissionsgitters (links) und erste Beugungsordnung (rechts). $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ($P = 32 \text{ mW}$). $\lambda_{\text{det}} > 500 \text{ nm}$.

Da die Photonen im spektralen Detektionsbereich über einen breiten horizontalen Bereich von etwa $10 \mu\text{m}$ pro Spektrum verteilt sind, wurde die Intensität durch Austausch der Anregungsquelle (iChrome FLE, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) erhöht. Auf diesem Wege konnten Einzelmolekülspektren von Terrylen in *p*-Terphenyl mit verbessertem SNR aufgenommen werden und die Lage des, bisher nur im Ensemble bestimmten, Emissionsmaximums bestätigt werden. Dazu wurde das Spektrum von fünf verteilten Einzelmolekülen aus Abbildung 46 verglichen. Aus der Abbildung geht hervor, dass zwischen verschiedenen Molekülen kaum spektrale Varianz gefunden wurde. Der Mittelpunkt der Maxima aus Abbildung 47a beträgt $582.3 \text{ nm} \pm 1.8 \text{ nm}$. Für Molekül 2 wurde ein Spektrum mit größtmöglicher Auflösung durch Mittelung der Grauwerte über 215 s bestimmt, wobei ein Emissionsmaximum von 582 nm erhalten wurde (Abbildung 47b). Neben dem Hauptmaximum lassen sich die Nebenmaxima bei 633 nm und 680 nm deutlich erkennen. Ebenfalls ist eine schwache Bande von 520 bis 540 nm erkennbar, die den Ramanlinien von *p*-Terphenyl zugeschrieben werden kann [200].

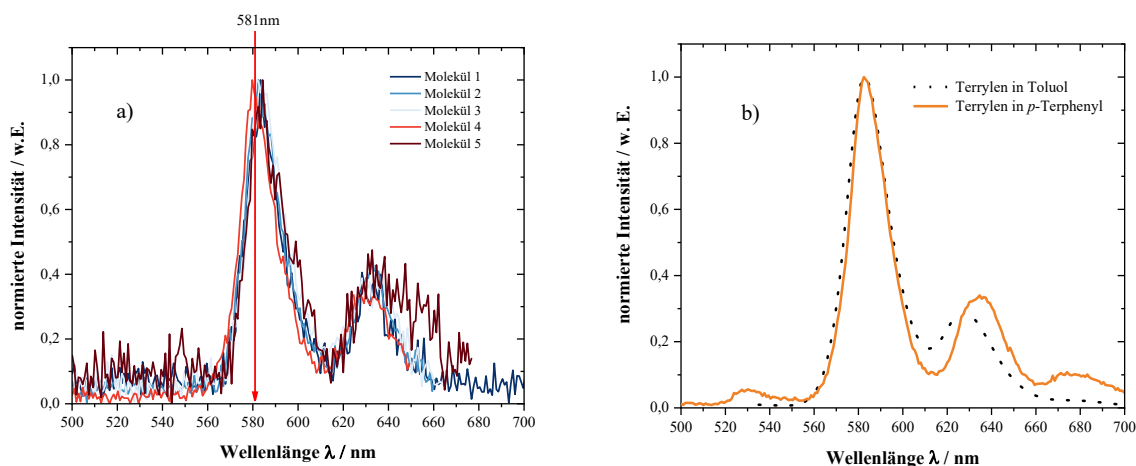


Abbildung 47: a) Überlagerte Einzelmolekülspektren von Terrylen in *p*-Terphenyl mit 5 s Belichtungszeit. Das Emissionsmaximum aus Ensembleexperimenten bei 581 nm wurde zum Vergleich eingezeichnet. b) Einzelmolekülspektrum von Molekül 2 aus Abbildung 46 über 210 s gemittelt und Emissionsspektrum in Toluol zum Vergleich der Linienform (gestrichelte Linie).

Die im Zuge einer Vertiefungsarbeit, in Kooperation mit R. Priester, an diesem Aufbau erhaltenen Daten [232] wurden für die vorliegende Dissertation aufgenommen und überarbeitet. Ziel der Arbeit war es, die Bleichprozesse mit dem modifizierten spektralen o-TIRF zu detektieren, um Einzelmolekülspektren der Photoprodukte zu erhalten.

3 Ergebnisse & Diskussion

Dabei gelang die Aufnahme einiger weniger Bleichprozesse durch Beobachtung einer signifikanten, horizontalen Verschiebung der Signale. Damit konnte bestätigt werden, dass im verwendeten TIRF-Aufbau hauptsächlich 40 nm hypsochrom verschobene Produkte aus der Photooxidation detektiert werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht der beobachteten Verschiebungen.

Tabelle 8: Emissionsmaxima λ_{max} im spektralen o-TIRF vor (t_1) und nach (t_2) der Verschiebung ^[232].

$\Delta\lambda$ / nm	$\lambda_{\text{max}, t1}$ / nm	$\lambda_{\text{max}, t2}$ / nm
6	586	592
12	601	589
39	545	503
41	546	505
43	576	533
69	583	514

Abbildung 48 und Abbildung 49 zeigen beispielhaft das Spektrum vor und nach einer Verschiebung um circa 40 nm und 70 nm. Da die Spektren jeweils nur wenige Sekunden vor und nach der Photooxidation aufgenommen werden konnten, sind die Daten aus diesen Ergebnissen stärker rauschbelastet als die stationären Spektren aus Abbildung 47.

Zwei Beispiele aus Tabelle 8 zeigen bereits vor der Verschiebung ein signifikant hypsochrom verschobenes Emissionsmaximum bei 545 nm. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Moleküle bereits einen Oxidationsschritt durchlaufen haben und sekundäre Reaktionen mit Sauerstoff beobachtet wurden. Aufgrund der Filtergrenzen des Bandpassfilters von 555 nm und 625 nm ist davon auszugehen, dass solche Reaktionsschritte in den Farbfilterexperimenten nicht detektiert wurden. Darüber hinaus werden auch kleinere Verschiebungen zu kurz- und langwelligeren Maxima beobachtet.

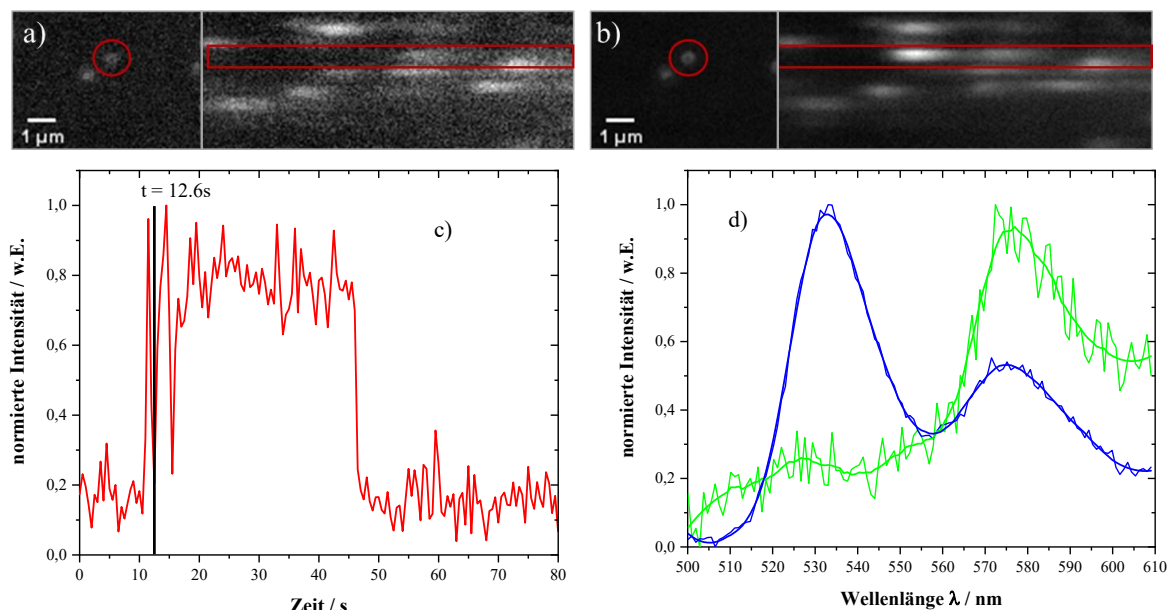


Abbildung 48: Bleichprozess mit 43 nm Verschiebung im spektralen o-TIRF. Dargestellt sind die gemittelten Aufnahmen des räumlichen und spektralen Bereichs. **a)** $t = 0-12.6$ s. **b)** $t = 12.6$ s–46 s. **c)** Zeitspur des Moleküls über den Beobachtungszeitraum. **d)** Erhaltene Rohspektren und geglättete Spektren aus a)/b) in grün/blau.

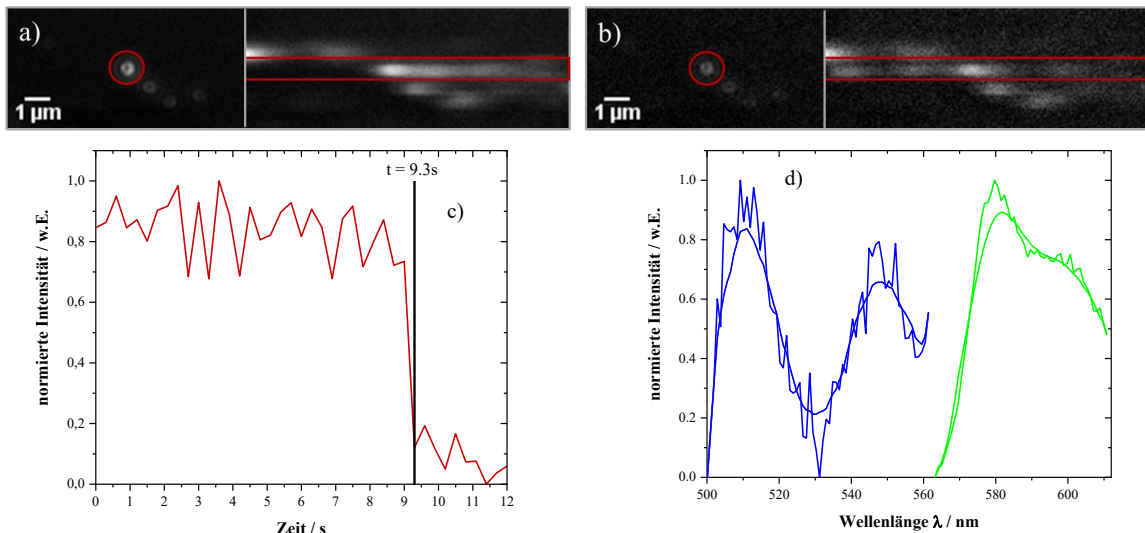


Abbildung 49: Bleichprozess mit 69 nm Verschiebung im spektralen o-TIRF. Dargestellt sind die gemittelten Aufnahmen des räumlichen und spektralen Bereichs. **a)** $t = 0\text{--}9.3\text{ s}$. **b)** $t = 9.3\text{ s--}46\text{ s}$. **c)** Zeitspur des Moleküls über den Beobachtungszeitraum. **d)** Erhaltene Rohspektren und geglätteten Spektren aus a)/b) in grün/blau.

3.1.7 Clusteranalyse

Aus den in Kapitel 3.1.4 diskutierten Filterspektren, der Literatur und den Ergebnissen aus der spektralen o-TIRF-Mikroskopie geht hervor, dass mit den bisher vorgestellten Untersuchungen nicht nur das Hauptprodukt der Photooxidation mit 40 nm hypsochromer Verschiebung detektiert wurde. Dafür sprechen die experimentell erhaltenen, unterschiedlichen Intensitätsverhältnisse der Zeitspuren im TSPB. Um einzuschätzen, welche Produkte in den Experimenten mit Farbkanälen detektiert wurden, bietet sich ein Vergleich der Intensitätsverhältnisse an. Tabelle 9 zeigt die detektierte Photonenrate k_{real} für Messungen aus beiden Anregungsintensitäten, jeweils für beide Detektionskanäle. Dazu wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Daten für den grünen Kanal mit Daten für den blauen Kanal ergänzt. Berechnungsgrundlage war abermals der Mittelwert der detektierten Photonen von zehn Emissionsmustern aus Experimenten zur Photooxidation.

Tabelle 9: Mittelwerte der detektierten Photonen, aufgetrennt nach Detektionskanälen.

$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$k_{\text{real}} / 10^4 \text{ s}^{-1}$ Grüner Kanal	$k_{\text{real}} / 10^4 \text{ s}^{-1}$ Blauer Kanal
488	0.72 ± 0.23	0.76 ± 0.42
488/546	3.54 ± 1.30	0.75 ± 0.70

Daraus geht hervor, dass in den Experimenten zur Photooxidation große Schwankungen in den absoluten Helligkeiten auftreten, die eine Zuordnung zu einzelnen Spezies über Absolutwerte erschweren. Zur Betrachtung der relativen, gemessenen Signalstärken wurden daher Intensitätsverhältnisse herangezogen. Dazu wurden mittlere Intensitätsverhältnisse aus Einzelmolekülspektren im blauen und grünen Kanal sowie aus Spuren im grünen Kanal aus dem Signal vor und nach dem Auftreten von TSPB gebildet. Details zum Vorgehen zeigen Abbildung 50 und Kapitel 4. Die Ergebnisse wurden in zwei Diagramme für die Ein- und Zweifarbanregung aufgeteilt (Abbildung 51), um Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Anregungs- und Detektionsparameter auszuschließen.

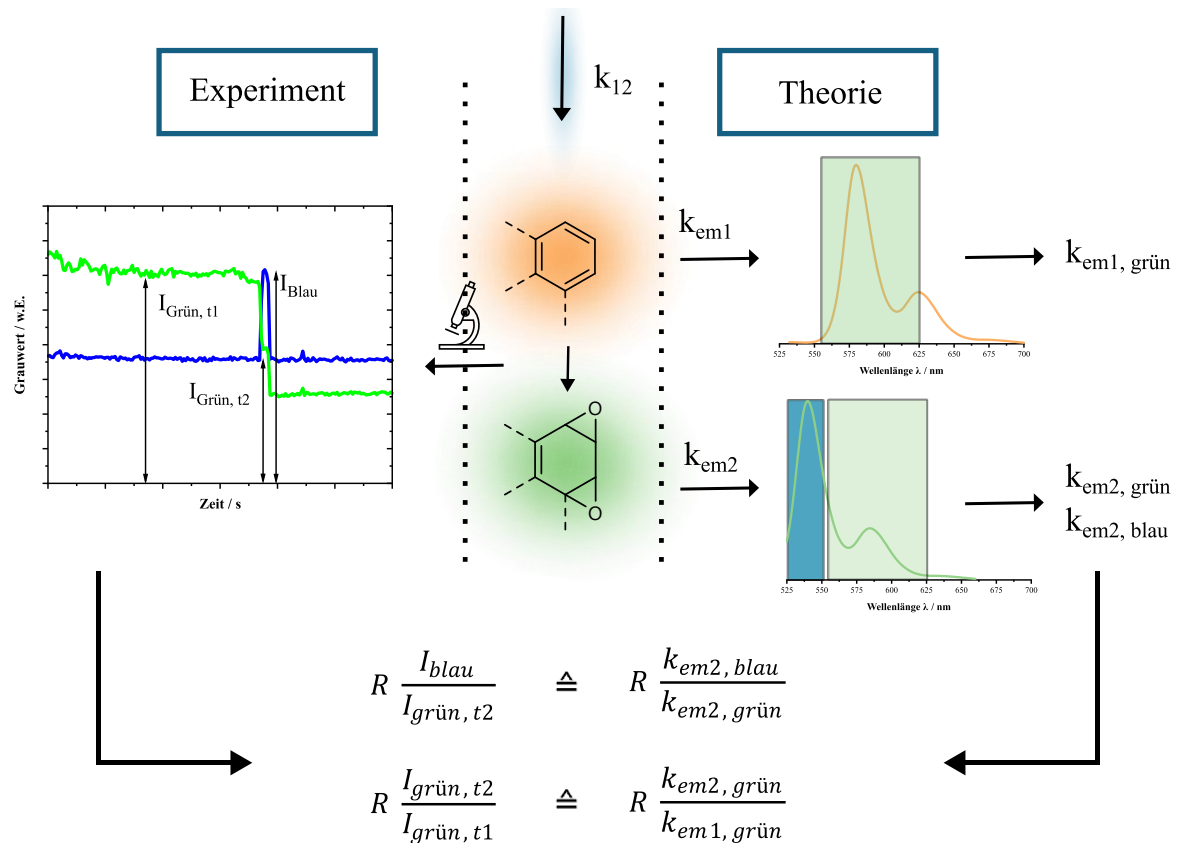


Abbildung 50: Arbeitsschema zur Bildung der Intensitätsverhältnisse am Beispiel der 40 nm Verschiebung.

Über die Extinktionskoeffizienten der simulierten Photoproduktspektren ließ sich über die Anregungsrate k_{12} die theoretische Emissionsrate k_{em} für die 40 nm und 70 nm Verschiebung analog zu Tabelle 2 ergänzen. Nach zusätzlicher Berücksichtigung der Spektrenanteile aus Tabelle 5 wurden theoretische Verhältnisse der Emissionsraten gebildet, die im Anschluss für eine Einordnung der experimentellen Verhältnisse herangezogen wurden. Die Ergebnisse der theoretischen Berechnungen zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 10: Übersicht der ermittelten effektiven Emissionsraten und theoretischen Intensitätsverhältnisse in den Detektionskanälen für das erwartete Produktspektrum der Photooxidation von Terrylen, berechnet anhand der Spektrenflächen aus Tabelle 5.

	40 nm Verschiebung		70 nm Verschiebung		Terrylen	
$\lambda_{exc} / \text{nm}$	488	488/546	488	488/546	488	488/546
$\epsilon_{\lambda=488} / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	2.50		2.03		1.19	
$\epsilon_{\lambda=546} / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	4.46		0		3.29	
$k_{em,x, \text{grün}} / 10^4 \text{ s}^{-1}$ „Emissionsrate Grüner Kanal“	6.62	11.00	2.5	2.5	6.02	12.2
$k_{em,2, \text{blau}} / 10^4 \text{ s}^{-1}$ “Emissionsrate Blauer Kanal”	8.47	0.51	9.00	5.13		
Theoretische Intensitätsverhältnisse						
$R(k_{em,2, \text{grün}} / k_{em,1, \text{grün}})$	1.10	0.90	0.42	0.20		
$R(k_{em,2, \text{blau}} / k_{em,2, \text{grün}})$	1.28	0.05	3.60	2.05		

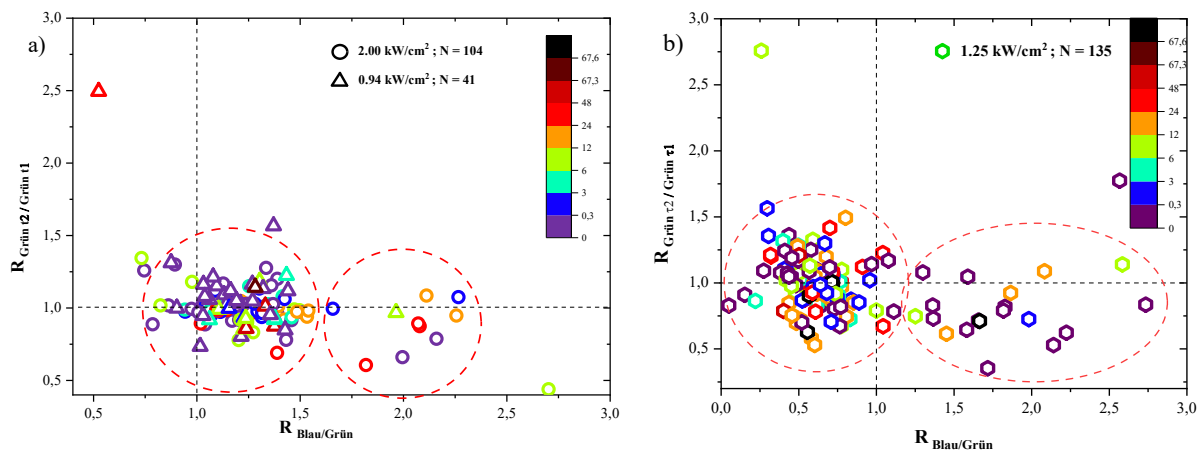


Abbildung 51: Intensitätsverhältnisse von Einzelmolekülpuren aus Aufnahmen mit Farbkanälen. **a)** Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (0.94 & 2.00 kW/cm^2). **b)** Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ (1.25 kW/cm^2). Die Farbcodierung der Messpunkte gibt die Überlebenszeit des Dunkelzustands wieder. Hilfslinien wurden bei $R = 1$ eingefügt.

Die qualitative Identifizierung von Gruppierungen wurde in Abbildung 51 mit roten Kreisen angedeutet. Intensitätsverhältnisse über 3.5 wurden aus Gründen der Erkennbarkeit nicht dargestellt und als Ausreißer betrachtet. Die erweiterten Graphen sind im Anhang aufgeführt. Bei Analyse der Auftragung lässt sich im Falle der Anregung mit 488 nm aus Abbildung 51a erkennen, dass die Zählrate im blauen Kanal in fast allen Fällen höher als im grünen Kanal lag.

Dies lässt sich mit dem höheren Anteil des Emissionsspektrums, der vom blauen Filter abgedeckt wird, erklären. Der größte Teil der Umsetzungen gruppiert sich um ein Intensitätsverhältnis von $R_{\text{Blau/Grün}} = 1.25$ und $R_{\text{Grün } t2 / \text{Grün } t1} = 1$. Das Emissionsniveau im grünen Kanal ändert sich also nicht maßgeblich. Dies liegt daran, dass die höhere Emissionsrate der hypsochrom verschobenen Oxidationsprodukte durch den geringeren Überlapp mit dem grünen Filter ausgeglichen wird. Eine kleinere Gruppe von 9 Umsetzungen lässt sich im Bereich $R_{\text{Blau/Grün}} = 2$ erkennen. Aus den theoretisch berechneten Intensitätsverhältnissen aus Tabelle 10 geht hervor, dass es sich bei den Umsetzungen mit höherem $R_{\text{Blau/Grün}}$ -Verhältnis um die 70 nm Verschiebung handeln müsste, während der größere Anteil bei $R_{\text{Blau/Grün}} = 1.25$ das vermutete Diepoxid bei 40 nm hypsochromer Verschiebung darstellt.

Für Abbildung 51b gruppieren sich die Verhältnisse im grünen Kanal ähnlich zu Abbildung 51a um $R_{\text{Grün } t2 / \text{Grün } t1} = 1$, jedoch sind die Werte auf der x-Achse deutlich unterhalb bei $R_{\text{Blau/Grün}} \approx 0.6$ angesiedelt. Dies lässt sich durch die verwendeten Filter und den dadurch kleineren, abgedeckten Wellenlängenbereich und der kleineren Überlappung mit den Emissionsspektren der Produkte erklären. Auch die absoluten Helligkeiten spiegeln dieses Verhalten wider, da bei Anregung mit 488/546nm deutlich weniger Photonen im blauen als im grünen Kanal detektiert wurden. Eine breit gestreute Gruppe von Umsetzungen siedelt sich im Bereich $R_{\text{Blau/Grün}} = 1.0 - 2.5$ an. Abermals lassen die theoretischen Intensitätsverhältnisse die Vermutung zu, dass die Ansammlung bei $R_{\text{Blau/Grün}} \approx 0.6$ dem Diepoxid zugeordnet werden kann, während die zweite Fraktion Verschiebungen um 70 nm darstellt. Eine Korrelation von Intensitätsverhältnissen mit der Überlebenszeit des Dunkelzustands ist für keines der Experimente aus Abbildung 51a oder b erkennbar.

Spuren mit direkter Umsetzung (Farbcodierung lila, $\Delta t_{\text{dark}} = 0$ s) werden über die gesamte Verteilung der Intensitätsverhältnisse beobachtet und treten demnach für unterschiedliche Produkte der Photooxidation auf. Beim Vergleich mit den theoretisch berechneten Intensitätsverhältnissen aus Tabelle 10 fällt auf, dass diese nur sehr bedingt die tatsächlichen Verhältnisse widerspiegeln. Vor allem das theoretische Verhältnis des Diepoxids von $R_{\text{Blau/Grün}} = 0.05$ bei Anregung mit 488/546 nm liegt deutlich unter dem tatsächlich erhaltenen Wert. Gründe sind hier erneut in der vereinfachten Abschätzung der Emissionsrate und Filtergrenzen sowie dem Einzelmolekülcharakter zu suchen. Die relative Abfolge der Verhältnisse sollte jedoch realistisch abgebildet sein.

Die bisher nur qualitativ gezogenen Grenzen der Intensitätsverhältnisse aus den Graphen in Abbildung 51 konnten zusätzlich durch das multivariate Verfahren der Clusteranalyse gestützt werden. Aus den Graphen in Abbildung 52 und Abbildung 53 ist zu erkennen, dass die Zuordnung und Bestimmung der Clustermittelpunkte unter Annahme von zwei Clusterzentren und somit zwei Photoprodukten, stimmig ist. Explorative Ansätze mit mehr als zwei Clusterzentren wurden im Anhang dargestellt. Aus diesen geht hervor, dass die Annahme von zwei Clusterzentren valide ist. Die Clusteranalyse ergibt für die Anregung mit 488 nm 10 Umsetzungen für Cluster 1 (rot/70 nm Verschiebung) sowie 134 Umsetzungen für Cluster 2 (blau/40 nm Verschiebung). Bei Anregung mit 488/546 nm werden 126 Umsetzungen für Cluster 1 (blau/40 nm Verschiebung) sowie 20 Umsetzungen für Cluster 2 (rot/70 nm Verschiebung) erhalten.

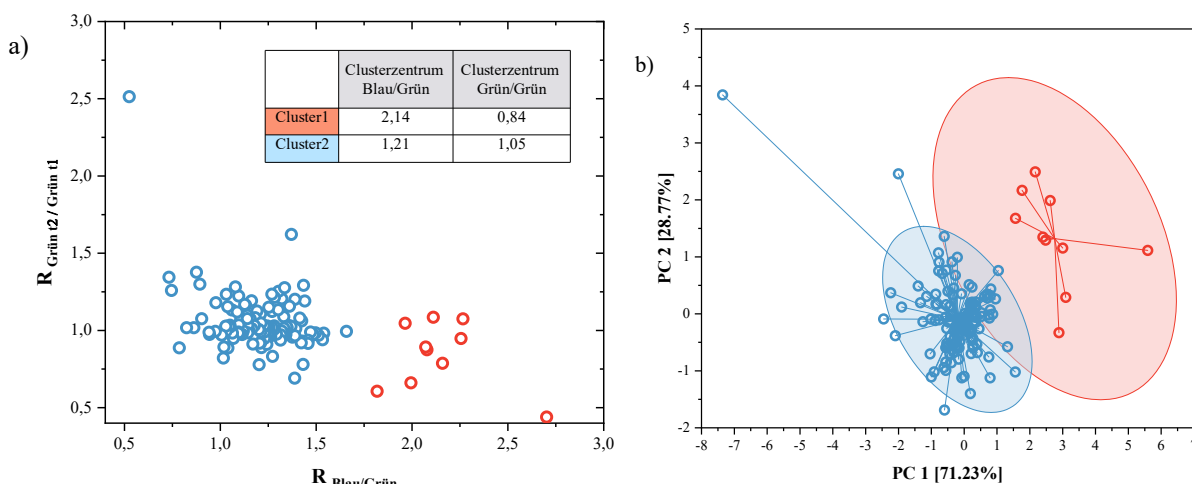


Abbildung 52: a) Zuordnung der Umsetzungen mit $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm zu den erhaltenen Clustern durch K-Means Clusteranalyse. b) Zugehöriges PCA Clusterdiagramm mit Konfidenzintervall 0.95. PC1 ist die Achse, die die größte Variation überspannt; PC2 ist die Achse, die die zweite Variation überspannt.

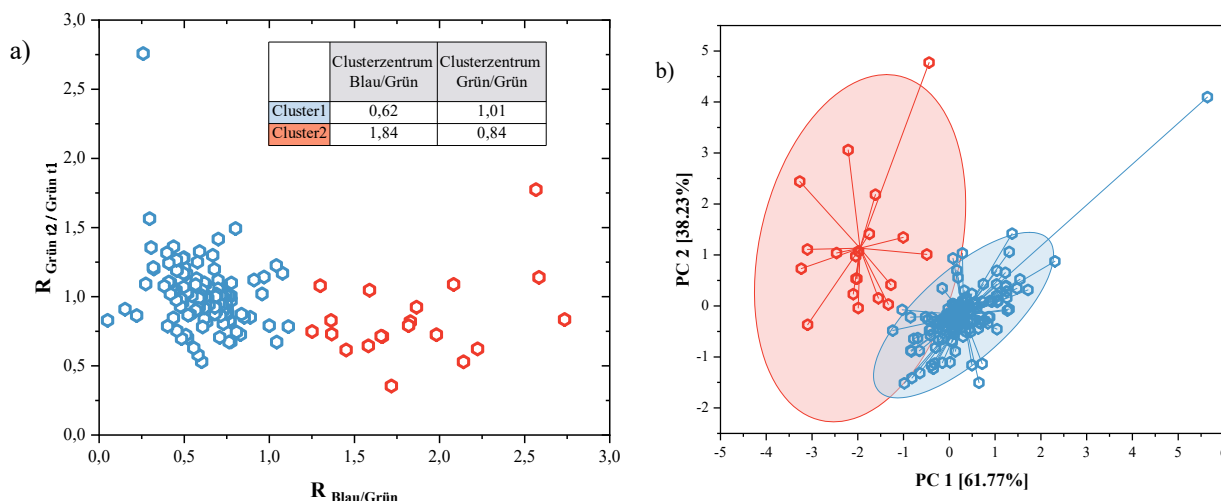


Abbildung 53: a) Zuordnung der Umsetzungen mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546$ nm zu den erhaltenen Clustern durch K-Means Clusteranalyse. b) Zugehöriges PCA Clusterdiagramm mit Konfidenzintervall 0.95. PC1 ist die Achse, die die größte Variation überspannt; PC2 ist die Achse, die die zweite Variation überspannt.

3.1.8 Weitere Beobachtungen

Untersuchungen zum Nachweis des Exoperoxids

Bisher wurden keine Schlussfolgerungen zur Natur des Exoperoxids gezogen. Durch die bereits erwähnte Lage der Anregungswellenlänge von 488 nm, relativ zum hypothetischen Absorptionsspektrum des Exoperoxids, wäre dessen Fluoreszenz durch die verwendeten Filter durchaus detektierbar. Da jedoch einstufiges Photobleichen ohne erneutes Aufleuchten auftritt, scheint dessen Absorption weiter als die theoretisch berechneten 100 nm hypsochrom verschoben zu sein. Alternativ könnte das Exoperoxid, analog zum Endoperoxid, nicht-fluoreszierend sein. Aufgrund von Berechnungen der AG Basché, als auch Berechnungen zum strukturell nah verwandten TDI, ist aber davon auszugehen, dass Exoperoxide hinreichend stabile, fluoreszierende Zersetzungsprodukte der Photooxidation darstellen. Bisherige Experimente zur Anregung des Exoperoxids sind nicht bekannt. Ein einfacher Nachweis wäre durch Anregung im kurzwelligen Bereich mit den verfügbaren Anregungslinien 405 nm oder 445 nm bis zur Grenze des sichtbaren Bereichs möglich.

In Kombination mit 488 nm wurden daher Messungen im o-TIRF durchgeführt. Damit sollte ein möglichst breiter Bereich abgedeckt werden und eine Detektion eines fluoreszierenden Exoperoxids als zweistufiges Photobleichen möglich sein. Für Anregung mit 405 nm, als auch abgeschwächt für 445 nm, konnte nur eine Zunahme des Fluoreszenzsignals in beiden Detektionskanälen beobachtet werden, die die Beobachtung von Einzelmolekülspuren unmöglich macht. Diese Zunahme kann einer photoinitierten Polymerisation des *p*-Terphenyl zugeschrieben werden, wie sie auch von T. Christ bei hohen Anregungsintensitäten von 440 kW/cm^2 bei Anregung mit 488 nm beobachtet wurde [200].

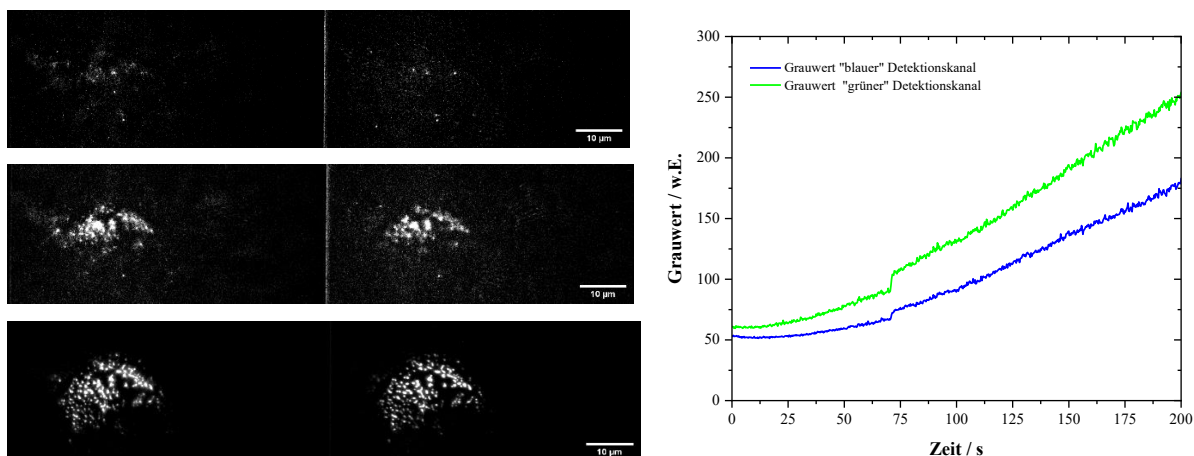


Abbildung 54: Anstieg des Fluoreszenzsignals im System Terrylen in *p*-Terphenyl in beiden Detektionskanälen bei gleichzeitiger Anregung mit 405 nm und 488 nm. $t = 0$ s, 34 s und 200 s. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488$ nm ($P = 15/15$ mW). $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}500$ nm (rechts); 555-625 nm (links).

Hinweise auf reversible Prozesse

Für vereinzelt auftretende Spuren von Molekülen konnte Verhalten beobachtet werden, das über das bisher beschriebene OSPB oder TSPB hinausging. Statt irreversiblen Bleichen wurden sekundäre Intensitätsänderungen beobachtet. Abbildung 55 zeigt die Zeitspur eines Moleküls, dessen Photooxidation augenscheinlich umgekehrt werden konnte. Zum Start der Aufnahme verweilt das Molekül in einem Dunkelzustand und das Fluoreszenzsignal taucht für 0.6 s zunächst nur im grünen Kanal auf. Im weiteren Verlauf tritt ein Intensitätswechsel analog zum TSPB auf, bei dem die Fluoreszenz im blauen Kanal detektiert wird und sich im grünen Kanal abschwächt. Nach 31 s wird der Prozess umgekehrt durchlaufen und das Molekül nimmt sein ursprüngliches Emissionsniveau ein, bevor es schließlich irreversibel bleicht. Das Intensitätsverhältnis aus den Rohdaten beträgt $R_{\text{blau/grün}} = 0.5$, womit eine 40 nm Verschiebung als zwischenzeitliches Reaktionsprodukt vermutet werden kann.

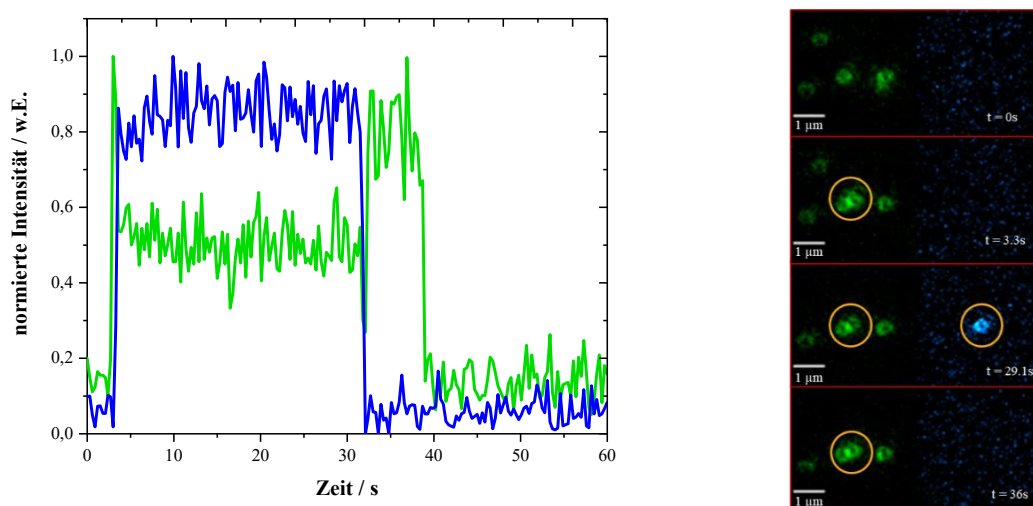


Abbildung 55: Beispiel 1 für ein Molekül im System Terrylen/*p*-Terphenyl, das reversible Änderungen der Intensität durchläuft. Links: Intensitätsverlauf. Rechts: Aufnahme der ROI um das betreffende Molekül. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546$ nm ($P = 15/5$ mW). Zeitauflösung 0.3 s.

3 Ergebnisse & Diskussion

Ein ähnliches Verhalten konnte für zwei weitere Moleküle beobachtet werden, die in Abbildung 56 und Abbildung 57 dargestellt sind. Im ersten Fall wurde TSPB mit vorgelagertem Dunkelzustand detektiert, gefolgt von einem weiteren Dunkelzustand bei 105 s, nach dem die Fluoreszenz im grünen Kanal wieder ansteigt. Anzumerken ist hier, dass das ursprüngliche Emissionssniveau des Ausgangszustands übertroffen wurde und das Signal im blauen Kanal nicht vollständig auf das Niveau des Untergrunds abfiel. Demnach könnte es sich bei der beobachteten Reaktion auch um eine Rotverschiebung unbekannter Natur handeln, dessen Emissionsspektrum zwischen dem Oxidationsprodukt und unverändertem Terrylen liegt. Der zweite Fall in Abbildung 56 zeigt TSPB und eine anschließende Rückkehr auf das Ausgangsniveau ohne detektierbaren Dunkelzustand zwischen den Intensitätssprüngen. Durch die unmittelbare Nähe mehrerer anderer, schwach leuchtender Moleküle, konnte für dieses Beispiel eine Überlagerung mit anderen Molekülsignalen nicht ausgeschlossen werden. Prinzipiell könnte das gezeigte Verhalten auch durch die zufällige Überlagerung mit einem blinkenden Einzelmolekül verursacht worden sein, das aus einem Dunkelzustand auftaucht und wieder abtaucht.

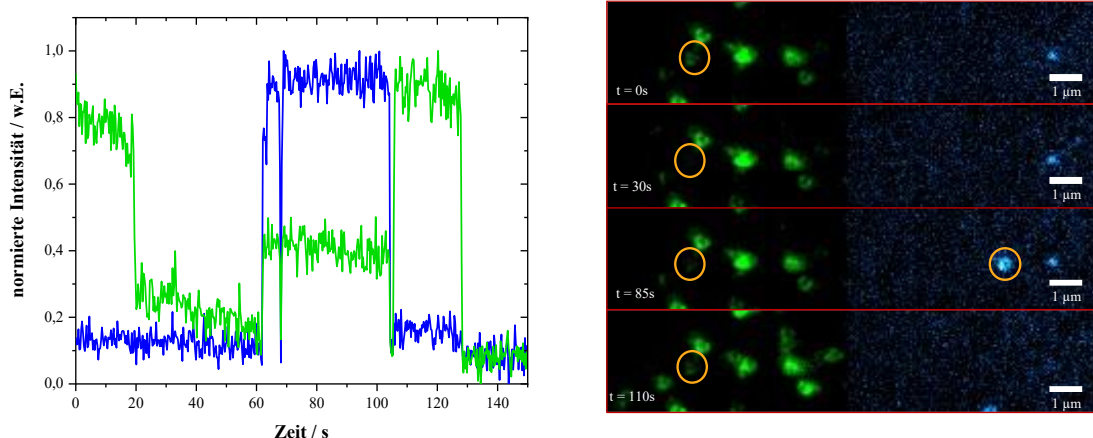


Abbildung 56: Beispiel 2 für ein Molekül im System Terrylen/*p*-Terphenyl, das reversible Änderungen der Intensität durchläuft. Links: Intensitätsverlauf. Rechts: Aufnahme der ROI um das betreffende Molekül. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s

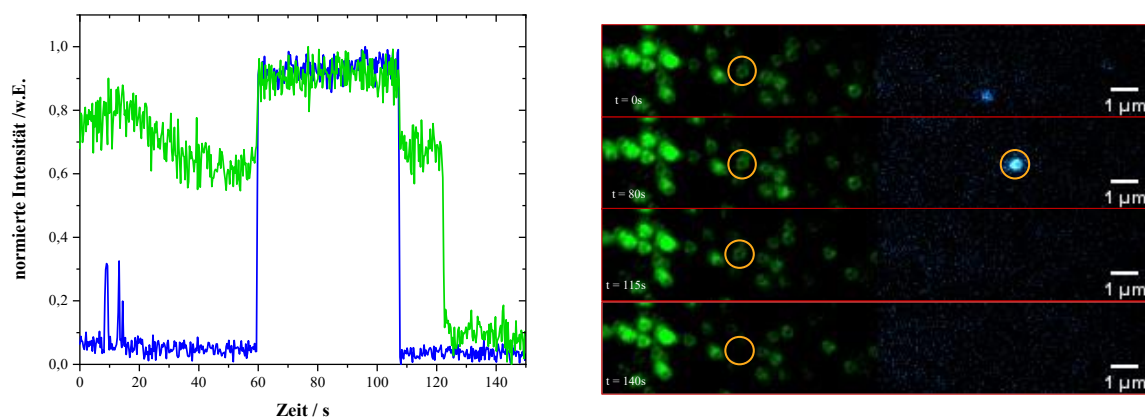


Abbildung 57: Beispiel 3 für ein Molekül im System Terrylen/*p*-Terphenyl, das reversible Änderungen der Intensität durchläuft. Links: Intensitätsverlauf. Rechts: Aufnahme der ROI um das betreffende Molekül. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$, $P = 15/5 \text{ mW}$, Zeitauflösung 0.3 s

erweitern ^[188,189,193,233].

bekannt, die zu bathochrom verschobener Emission führen können [37,197].



Abbildung 58: Reaktionsschritte zur reversiblen Photooxidation von Terrylen. Adaptiert aus [193].

3.2 Photosäuren als dual-emissive Sonden auf der Einzelmolekülebene – Modellsystem für die Grenzfläche Fest/Flüssig

Kapitel 3.2 befasst sich mit der spektroskopischen Untersuchung der Silylschutzgruppenchemie an Photosäuren. Motivation war die bisher beobachtete Instabilität, insbesondere bei der Verwendung dieser Gruppen bei der Synthese von Superphotosäuren auf Basis von Pyrenol ^[211]. Ziel war es daher, zum einen, Bedingungen für eine höhere Stabilität der Schutzgruppe zu finden und, zum anderen, die Reaktion mittels TIRFM explorativ auf dem Einzelmolekülniveau zu untersuchen. Aufgrund der simplen Reaktionsführung stellt die Silylschutzgruppenchemie ein ideales Modell für die Übertragung auf das Einzelmolekülniveau dar, um Einblicke in das Reaktionsschema und die Reaktivität von Photosäuren zu erlangen. Zunächst werden, nach einer kurzen Vorstellung der verwendeten Modellverbindungen, die Ergebnisse der optimierten Reaktionsbedingungen vorgestellt und die Schritte zur Übertragung auf das TIRF-Mikroskop geschildert. Die Leistungsfähigkeit der TIRF-Mikroskopie wird abschließend anhand der Ergebnisse der Einzelmoleküluntersuchungen für die ermittelten Reaktionsbedingungen demonstriert. Experimentelle Methoden sind in Kapitel 4.2.5 ausführlich beschrieben.

3.2.1 Charakterisierung der Schutzgruppenreaktion im Ensemble

Vorstellung der Photosäuren im Ensemble

In bisherigen Arbeiten von A. Clasen wurde die asymmetrische Photosäure Bis(2,2,2-trifluoroethyl) 3-(chlorosulfonyl)-8-hydroxypyren-1,6-disulfonat aus Abbildung 59, im Folgenden mit HPDE-Cl bezeichnet, auf Basis von Pyrenol synthetisiert. Durch Einführung von APTES konnte die Photosäure mit einer Ankergruppe für die chemische Immobilisierung an SiO₂-Oberflächen funktionalisiert werden (HPDE-APTES) ^[210]. Die Eignung der Verbindung für die Untersuchung von Einzelmolekülumsetzungen konnte bereits von J. Menges anhand einer Palladium-katalysierten Entschützung der allylierten Photosäure demonstriert werden. Dabei erwies sich die hohe Photostabilität als Vorteil und die Reaktion konnte durch das Auftreten der spektral getrennten Basenfluoreszenz nachgewiesen werden ^[35,234]. Abbildung 60 zeigt die elektronischen Spektren von HPDE-APTES.

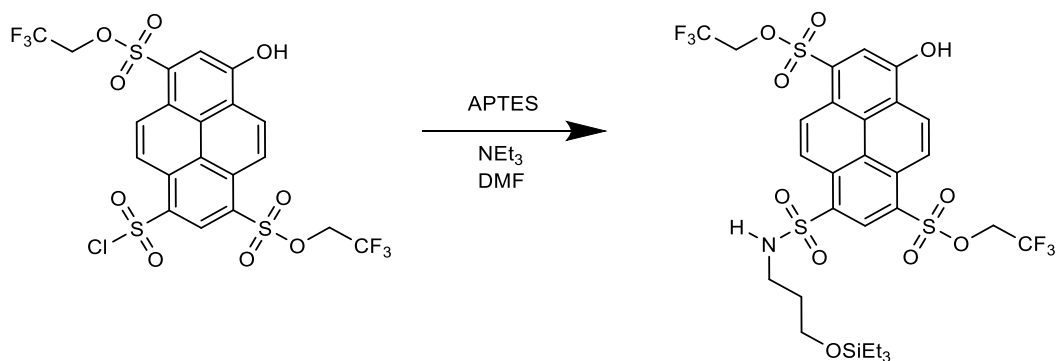


Abbildung 59: Funktionalisierung von HPDE-Cl mit APTES zum Erhalt der immobilisierbaren Spezies HPDE-APTES.

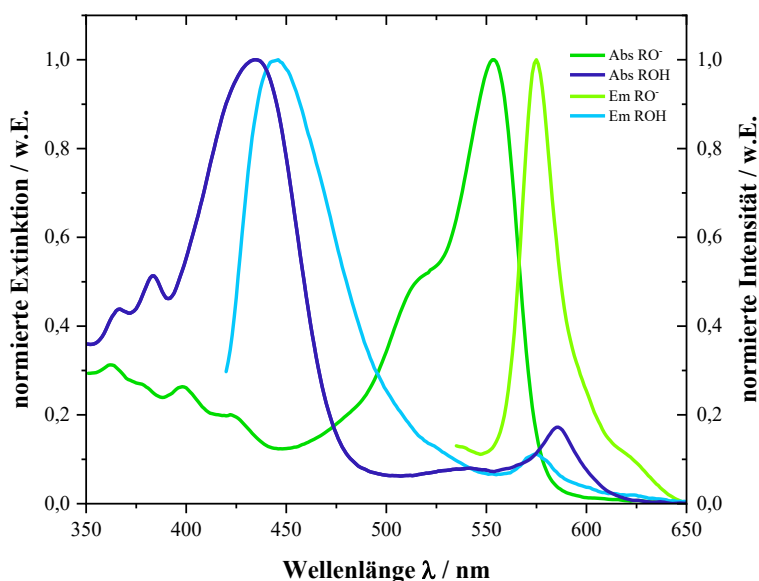


Abbildung 60: Elektronische Spektren der protonierten und deprotonierten Form von HPDE-APTES in Acetonitril.

Zur Untersuchung und Optimierung der Reaktionsbedingungen einer Silylierung im Ensemble zeigte sich die Verwendung von HPDE als nachteilig. HPDE-APTES wurde, wegen mangelnder Lagerstabilität, vor Gebrauch für alle Messungen aus HPDE-Cl nach dem Schema in Abbildung 59 hergestellt. Somit wurde sichergestellt, dass die Ankergruppe ihre Reaktivität behält. Dabei konnte jedoch keine Abtrennung von überschüssigem NEt_3 , APTES und DMF erfolgen. 1-2 Stunden nach Ansetzen der Lösung kann die Bildung eines Niederschlags beobachtet werden, der mit einer basenkatalysierten Quervernetzung des APTES-Linkers und Bildung von Siloxanen erklärt werden kann. Die einsetzende Quervernetzung ist vermutlich auch die Ursache für die breiten Absorptionsbanden und Unterschiede in den Absorptionsmaxima der deprotonierten Spezies (Abbildung 60). Die Strategie für die experimentellen Untersuchungen konzentrierte sich daher auf das strukturell verwandte HPTE aus Abbildung 61 als Modellverbindung. Dadurch konnten eine Beeinflussung der reaktiven Ankergruppe und Nebenreaktionen mit den Kopplungsreagenzien ausgeschlossen und die Erkenntnisse dennoch für die Einzelmoleküluntersuchung von HPDE-APTES genutzt werden. Ziel war es, die Reaktion in Acetonitril abzubilden, da es sich wegen des niedrigeren Brechungsindex besser für eventuelle TIRF-Experimente eignet.

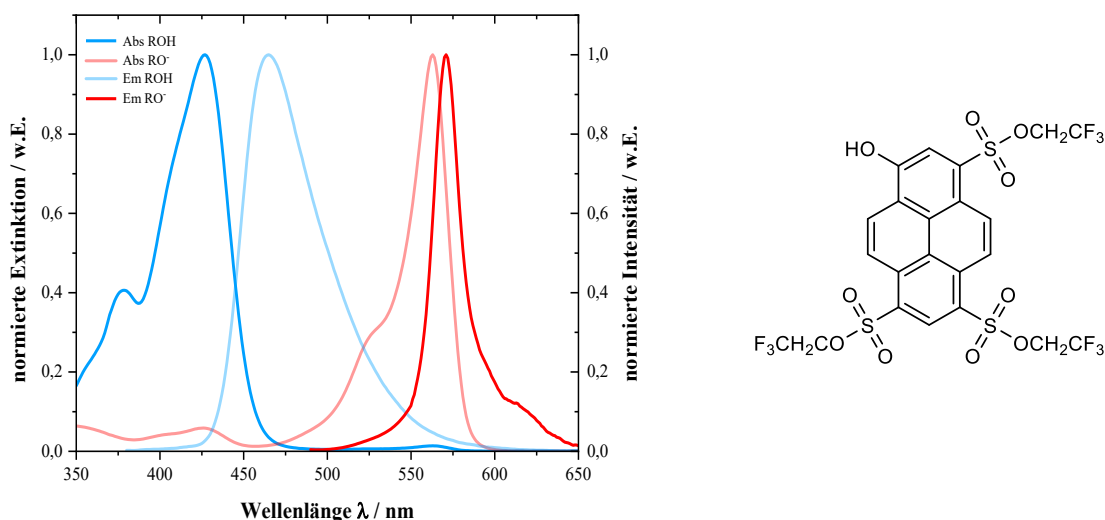


Abbildung 61: Elektronische Spektren von HPTE in Acetonitril und Strukturformel der protonierten Form.

Tabelle 11: Spektroskopische Parameter der untersuchten Photosäuren.

	$\lambda_{\text{Abs}} (\text{ROH}/\text{RO}^-) / \text{nm}$	$\lambda_{\text{Em}} (\text{ROH}/\text{RO}^-) / \text{nm}$	$\text{pK}_\text{S} / \text{pK}_\text{S}^* / \Delta \text{pK}_\text{S}$	Φ_Fl
HPDE-APTES	435/554	446/575	6.1 / -1.8 / 7.9 ^[210]	89%* ^[210]
HPTE	427/563	465/571	4.6 / -2.7 / 7.3 ^[209]	87%** ^[209]

* in DMSO und immobilisiert an SiO_2 -Partikeln. ** in DMSO.

Ergebnisse zur Schützung von HPTE im Ensemble

Abbildung 62 zeigt die stationären Spektren von HPTE im Küvettenexperiment, bei dem Absorptions- und Emissionsspektren der Basenform (Notation RO^-), Säureform (Notation ROH) sowie der geschützten Spezies (Notation RO-TBDPS bzw. RO-TBDMS) durch die angegebenen Reagenzien im Überschuss erhalten wurden. Dabei wurde durch Zugabe von TBDMS-Cl zur deprotonierten Spezies eine, im Vergleich zur protonierten Form, um 8 nm hypsochrom verschobene Bande mit 420 nm Absorptionssmaximum sowie 460 nm Emissionsmaximum erhalten.

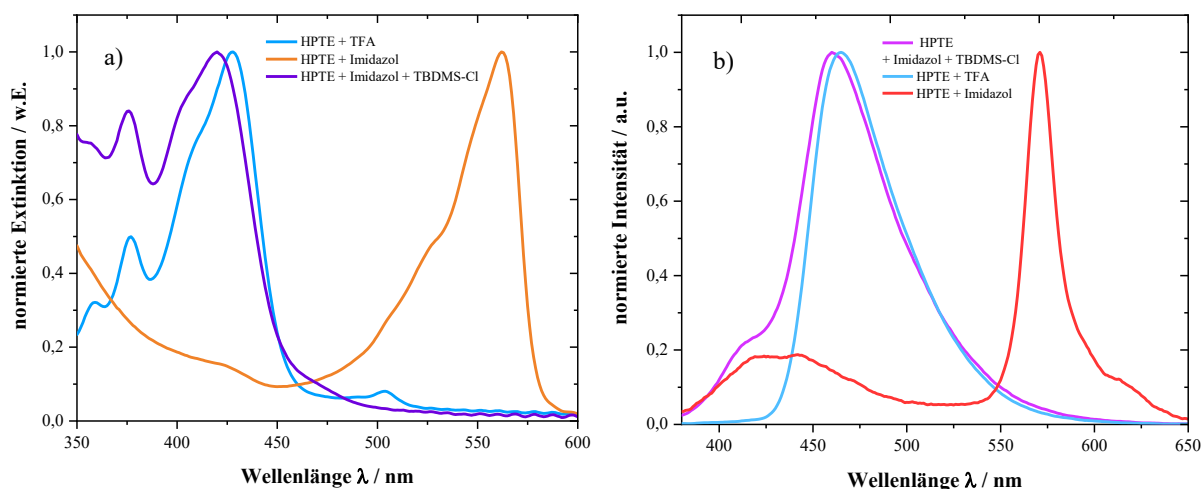


Abbildung 62: a) Absorptions- und b) Emissionsspektren von HPTE in Acetonitril nach Zugabe von TFA, Imidazol und TBDMS-Cl .



Abbildung 63: Küvetten mit einer 10 µM Lösung von HPTE in Acetonitril vor (RO⁻, links) und nach (RO-TBDPS, rechts) Zugabe von Silylierungsmittel unter UV-Licht.

Abbildung 64 zeigt den detaillierten Verlauf der Fluoreszenz der Basenform bei Zugabe von Silylierungsmittel über einen Zeitraum von 60 bzw. 30 min. Neben der Corey Methode mit einem Überschuss an Silylierungsmittel und Base, wurde auch die Schützung mit der für Acetonitril entwickelten Methode nach Verkade evaluiert.

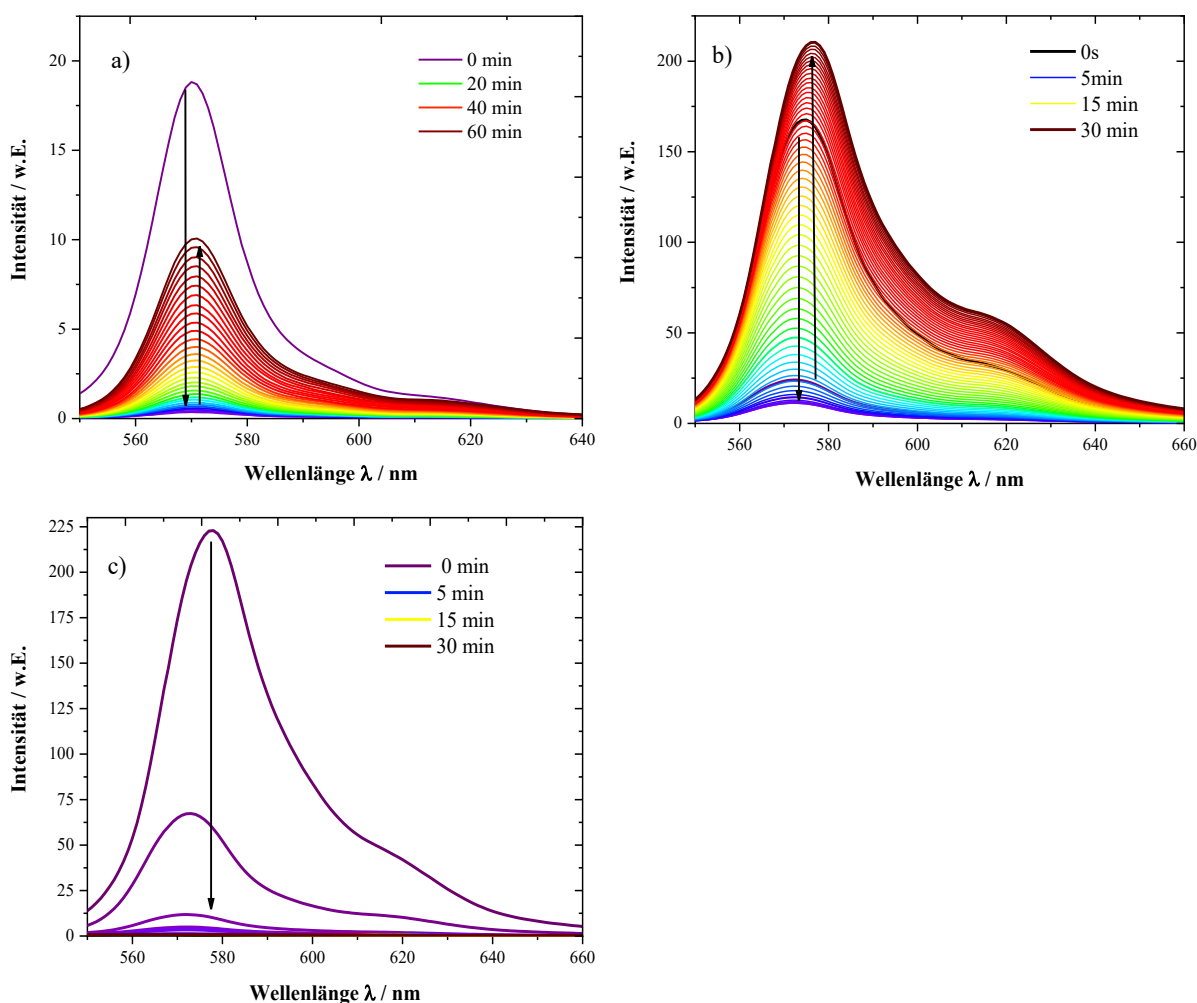


Abbildung 64: Fluoreszenzemissionsspektren von HPTE (RO⁻) in Acetonitril mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen im Zeitabstand 10 s **a)** 100 eq Imidazol / 25 eq TBDMS-Cl. **b)** Literaturansatz nach Verkade^[218] 0.1 eq Verkade Superbase 1.1 eq NEt₃ / 1 eq TBDMS-Cl. **c)** 1 eq Verkade Superbase / 1 eq TBDMS-Cl.

Aus den Experimenten zeigt sich für die ersten beiden Methoden die hohe Instabilität der geschützten Photosäure. Bei Zugabe mehr als eines Äquivalents einer Hilfsbase konnte die Zersetzung der geschützten Spezies beobachtet werden. Diese äußerte sich dadurch, dass die Intensität der Basenfluoreszenz nach der initialen Abnahme wieder anstieg. Bei der Verwendung eines Äquivalents der Verkade Base ohne zusätzliche Hilfsbase konnte kein Wiederanstieg der Fluoreszenz über 30 min beobachtet werden. Zudem lief die Reaktion deutlich schneller ab. Den Absorptionsspektren aus Abbildung 64c und Abbildung 65 ist zu entnehmen, dass die Reaktion bei Verwendung genau eines Äquivalents der Verkade Base sowie des Silylierungsmittels vollständig ablief und die geschützte Variante über mindestens 24 h in Lösung stabil blieb. Ein kleiner Anteil Photosäure von 5 % ließ sich auch bei höheren Basenkonzentrationen nicht deprotonieren. Die entsprechende Bande kann der Anregung in den zweiten angeregten Zustand (S₂) der deprotonierten Form zugeschrieben werden. Die hohen Instabilitäten bei Anwesenheit von Base sind, wie bereits von B. Finkler vermutet, der guten Stabilisierung des Anions der Photosäure zuzuschreiben ^[211].

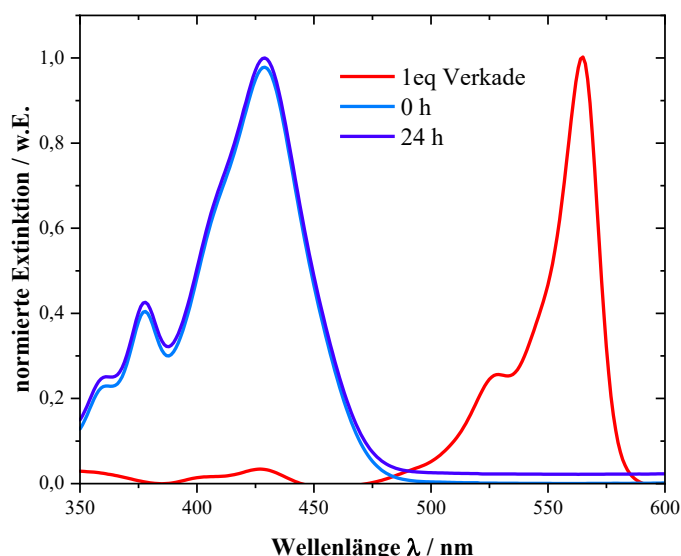


Abbildung 65: Normierte Absorptionsspektren von HPTE in Acetonitril zur Untersuchung der Langzeitstabilität nach Schützung mit 1eq TBDMS-Cl und vorheriger Deprotonierung mit 1eq Verkade.

Beim Vergleich unterschiedlicher Silylierungsmittel zeigten sich zwischen TBDPS-Cl und TBDMS-Cl kaum Unterschiede. Mit TMS-Cl konnte hingegen nur im Überschuss eine teilweise Umsetzung erreicht werden (siehe Anhang, Kapitel 7.1.3). Als Silylierungsmittel der Wahl wurden daher TBDPS-Cl und TBDMS-Cl verwendet. Für TBDPS-Cl konnten wegen des höheren sterischen Anspruchs höhere Stabilitäten erwartet werden. Im Reaktionsverlauf wird die Photosäure im ersten Schritt durch die Zugabe eines Äquivalents der Verkade Base nahezu vollständig deprotoniert. Deprotoniertes HPTE kann mit dem Silylierungsmittel anschließend in einer nukleophilen Substitution am Siliziumatom (S_N2@Si ^[235]) reagieren. Eine Bindung des Silylierungsmittels an die Verkade Base und ein Vorliegen eines katalytischen Zyklus, wie in der Literatur beschrieben ^[217,221], kann für HPTE unter diesen Bedingungen eher ausgeschlossen werden. Die Verkade Base sollte durch die Reaktion mit der Photosäure vollständig protoniert vorliegen.

3 Ergebnisse & Diskussion

Für die Reaktion wurde daher ein bimolekularer Mechanismus vermutet und die Reaktionsgeschwindigkeit sollte von der Konzentration der Photosäure und des Silylierungsmittel abhängig sein. Zur Untersuchung der Kinetik wurde die Abnahme des Intensitätsverlaufs am Emissionsmaximum der Basenbande sowie die Zunahme des Intensitätsverlaufs am Emissionsmaximum der geschützten Photosäure über die Zeit analysiert. Dabei ergaben sich die in Abbildung 66 dargestellten Ergebnisse.

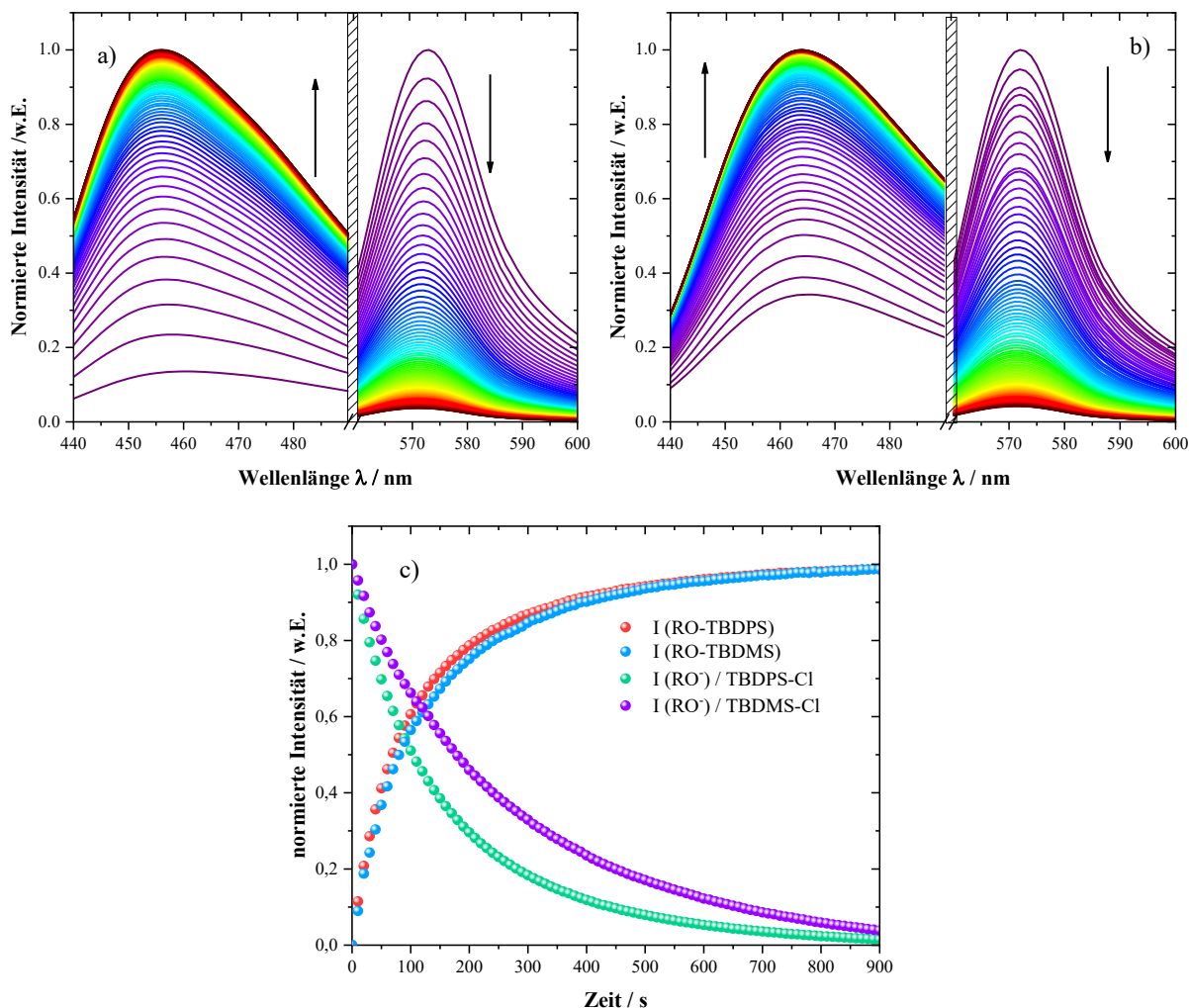


Abbildung 66: Intensitätsverlauf des Emissionsmaximums von HPTE unter verschiedenen Bedingungen. Gezeigt ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von RO- sowie die Zunahme der Fluoreszenzintensität der geschützten Spezies **a)** bei Zugabe von TBDPS-Cl und **b)** bei Zugabe von TBDMS-Cl über die Zeit sowie **c)** die Auftragung der Intensität der Emissionsmaxima gegen die Zeit.

Aus der Auftragung der RO⁻-Konzentration (lila) ist eine leicht verzögerte Bildung der geschützten Spezies bei Verwendung von TBDPS-Cl ersichtlich, die dem höheren sterischen Anspruch der Triisopropylgruppen zugeschrieben wurde. Die Geschwindigkeitskonstanten für eine Reaktion 2. Ordnung wurden in einer Dreifachbestimmung aus der Steigung der linearen Anpassung des Fluoreszenzsignals aus der Produktbildung (k_p) sowie der Eduktabnahme (k_s) aus Abbildung 67 erhalten und in Tabelle 12 aufgeführt.

3 Ergebnisse & Diskussion

Sie liegen in der Größenordnung von bereits literaturbekannten Umsetzungen von HPTE [217,226]. Die erhaltenen Werte unterliegen jedoch hohen Schwankungen, die auf die hohe Empfindlichkeit der Reaktion hindeuten. Mögliche Gründe sind Zersetzungen und Reaktionen der Reagenzien mit Wasser, die trotz Verwendung trockener Lösungsmittel und Lagerung unter Schutzgas nicht vollständig auszuschließen waren.

Tabelle 12: Erhaltene Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für eine Reaktion zweiter Ordnung aus den Auftragungen aus Abbildung 67.

Reagenz	$k_{\text{a}}/10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{p}}/10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
TBDMS-Cl	1.54 ± 0.40	0.60 ± 0.23
TBDPS-Cl	1.37 ± 0.70	1.11 ± 0.54

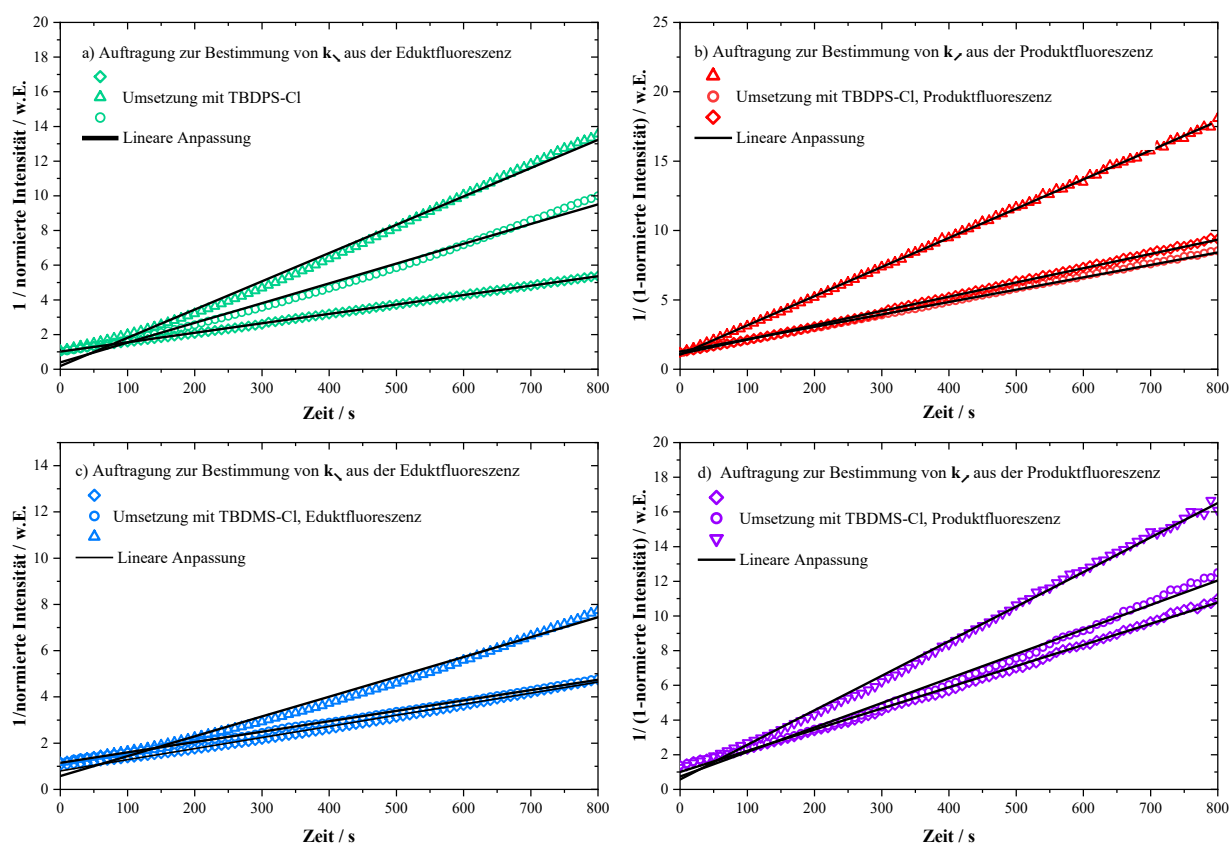


Abbildung 67: Auftragung der reziproken, normierten Fluoreszenzsignale. **a)** Aus dem Abbau von HPTE (RO^-) **b)** Aus der Bildung von HPTE-TBDPS. **c)** Aus dem Abbau von HPTE (RO^-). **d)** Aus der Bildung von HPTE-TBDMS. $[\text{HPTE}] = [\text{R}_3\text{-SiCl}] = 10 \mu\text{M}$.

Verwendung alternativer Basen

Alternativ konnte die Silylierung auch mit NaH als Base in Acetonitril durchgeführt werden. Von Vorteil war dabei, dass das Auftreten eines katalytischen Zyklus definitiv ausgeschlossen werden kann, da die Silylierungsmittel nicht an NaH binden können. Die entsprechenden Spektren aus Abbildung 68 zeigten, dass die Photosäure damit ebenfalls effektiv deprotoniert werden kann und die Reaktion mit zufriedenstellendem Umsatz trotz basischer Bedingungen abläuft. Über einen Zeitraum von 24 h zeigte sich die Zersetzung eines nur kleinen Anteils.

Die Zersetzung wurde vermutlich durch überschüssiges NaH initiiert, welches zunächst mit einem Restgehalt von Wasser reagiert. Die Entschützung erfolgt im Anschluss vermutlich durch OH⁻-Ionen, die die Schutzgruppe in einer nukleophilen Substitution ersetzen.

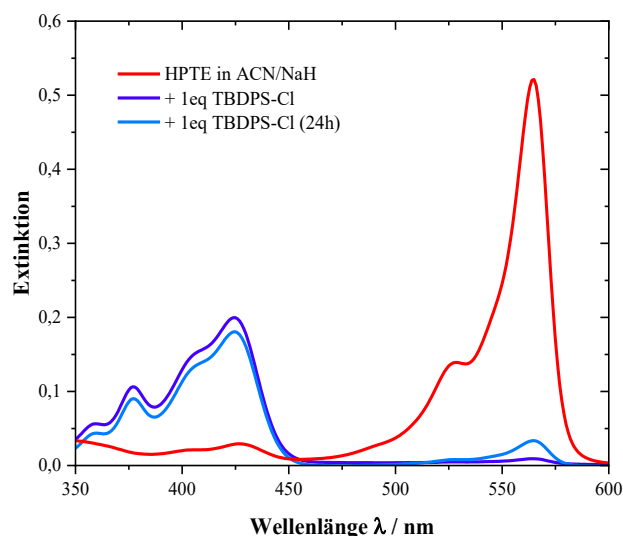


Abbildung 68: Absorptionsspektren aus den Versuchen mit NaH. Abgebildet ist das Absorptionsspektrum von HPTE in mit NaH behandeltem Acetonitril sowie das Absorptionsspektrum nach Zugabe von 1eq TBDPS-Cl nach vollständigem Umsatz sowie nach zusätzlichen 24 h. [HPTE] = [TBDPS-Cl] = 10 μM.

Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten aus kinetischen Untersuchungen bei Verwendung von NaH liegen bei ähnlichen Werten wie bei Verwendung von Verkade Superbase und betragen für die Produktbildung $k_p = 2300 (\pm 10) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für den Eduktverbrauch $k_v = 1160 (\pm 10) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Auftragungen (Abbildung 69) weichen, verglichen mit der Verkade Superbase, stärker vom linearen Verhalten ab und zeigen höhere Unterschiede zwischen k_p und k_v . Als Ursache kann eine Überlagerung mit der Entschützungsreaktion durch überschüssiges NaH vermutet werden.

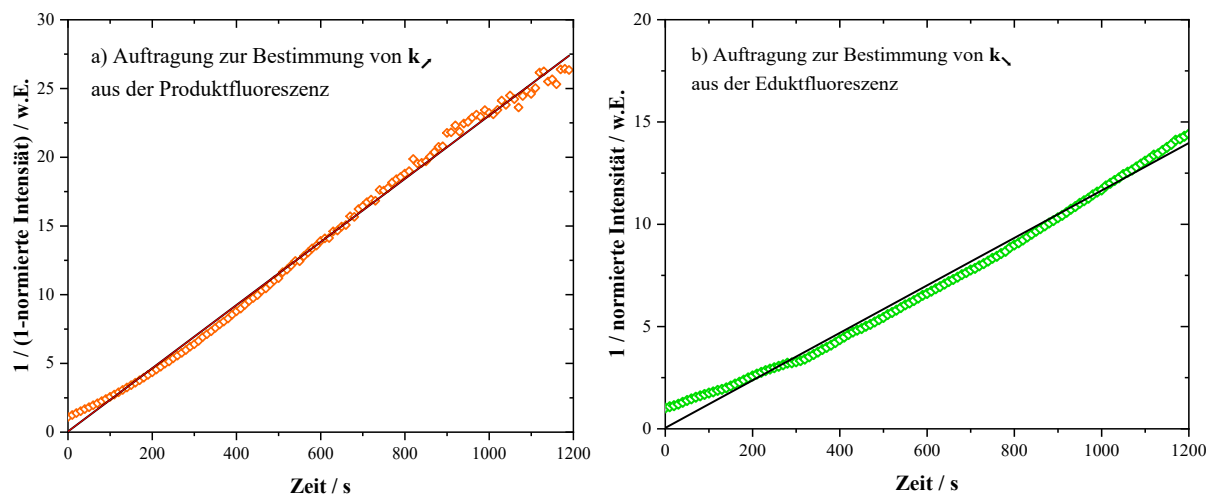


Abbildung 69: Auftragung der reziproken, normierten Fluoreszenzsignale für HPTE in ACN/NaH aus der Reaktion mit TBDPS-Cl. a) Bildung von RO-TBDPS. b) Verbrauch von RO⁻.

Ergebnisse zur Untersuchung der Entschützung von Photosäuren

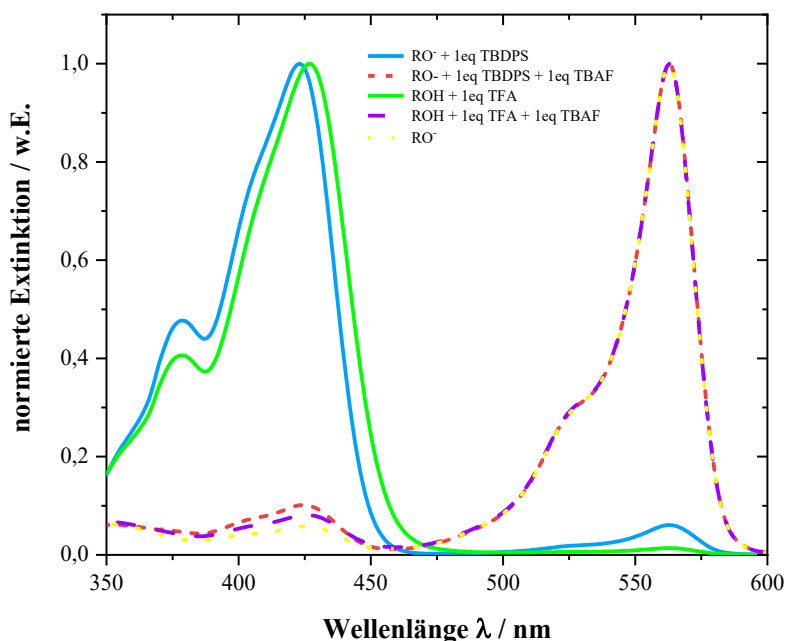


Abbildung 70: Absorptionsspektren aus den Entschützungsversuchen von HPTE mit TBDPS-Cl und TBAF in Acetonitril. [HPTE] = 10 μ M.

Für die Untersuchung der Entschützung im Ensemble wurde TBAF als Reagenz der Wahl zu einer Lösung der geschützten Photosäure HPTE in Acetonitril zugegeben. Dabei wurden die in Abbildung 70 aufgeführten Spektren erhalten, die zeigten, dass die Entschützung mit einem Äquivalent TBAF erfolgreich gelang. Im Kontrollexperiment mit der mittels TFA protonierten Form wurde jedoch ersichtlich, dass mit TBAF auch eine Deprotonierung der Photosäure erfolgen und keine selektive Reaktionsführung gelingen konnte. Dabei fungieren die F^- -Ionen, trotz relativ geringer Basenstärke ($pK_B = 10.81$ ^[236]), als Protonenakzeptor. Bereits aus den vorher geschilderten Experimenten lässt sich ableiten, dass die Entschützung auch durch Zugabe von Basen im Überschuss gelingen kann.

3.2.2 Überlegungen zum Transfer auf das Einzelmolekülniveau

Für die Untersuchung der vorliegenden Reaktion im TIRF wurde die beste Strategie für den Transfer aus den Ensemble-Messungen abgeleitet. Ziel war es dabei, die Schützung der deprotonierten Photosäure sowie die anschließende Abspaltung mit einem geeigneten Reagenz innerhalb einer Messung abzubilden, analog zum Schema aus Abbildung 71. Für die Anregung wurden die Wellenlängen 488 nm und 405 nm gewählt, die jeweils zur Anregung der deprotonierten und protonierten bzw. geschützten Photosäure genutzt werden können. Durch den nur geringen spektralen Unterschied zwischen geschützter und protonierter Photosäure, waren die Farbfilter im TIRF-Experiment nicht selektiv genug, um zwischen den beiden Formen unterscheiden zu können. Bedingt durch die Basenlabilität der geschützten Spezies wurden statt TBAF auch starke Basen wie NaH und die Verkade Base als Reagenzien für die Initiierung der Entschützung in Erwägung gezogen.

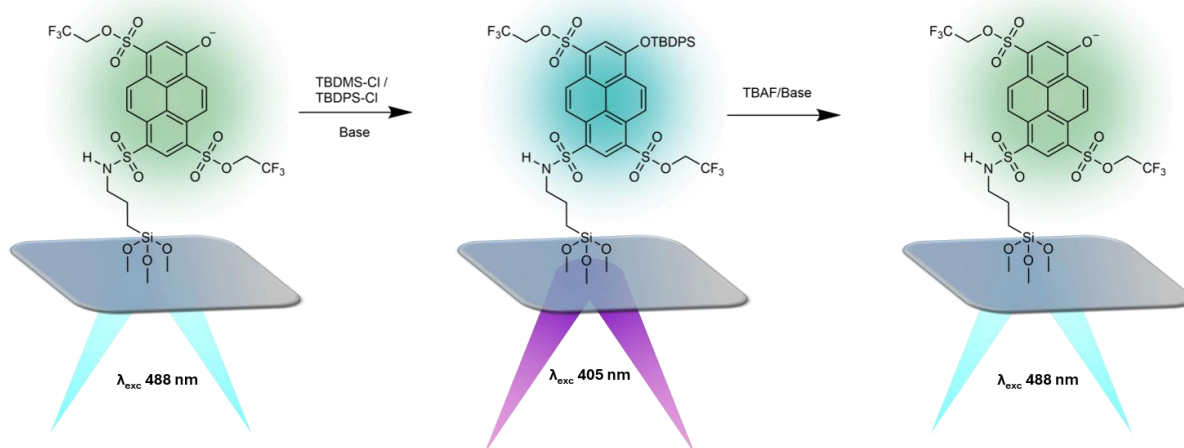


Abbildung 71: Reaktionsschema für die Beobachtung der Schutzgruppenchemie mit HPDE-APTES im Einzelmolekülexperiment.

Um die Reaktivität und Realisierbarkeit der Reaktion anhand der immobilisierten Photosäure zu verifizieren, wurde ein Experiment mit Deckgläsern unter TIRF-Anregungsbedingungen bei hohen Konzentrationen der Reaktanden durchgeführt. Dazu wurde HPDE-APTES in hoher Konzentration auf Deckgläsern immobilisiert und mit den Anregungswellenlängen 405/488 nm in Acetonitril beleuchtet. Abbildung 72 zeigt die Aufnahmen der Deckgläser. Dabei wurde die Visualisierung der Fluoreszenz durch Verwendung eines 405/488 nm Notchfilters vor der Kamera möglich gemacht. In reinem Acetonitril konnte zunächst eine Mischform der Fluoreszenz von ROH und RO⁻ Form erkannt werden. Nach Zugabe der Verkade Base (10 mM) war deutlich die grüne Fluoreszenz der Basenform RO⁻ zu erkennen. Nach Zugabe einer TBDPS-Cl-Lösung (60 mM) änderte sich diese instantan zur blauen Fluoreszenz der geschützten Photosäure, was als deutlicher Hinweis auf die gelungene Realisierung der Reaktion in immobilisierter Form angesehen werden konnte.

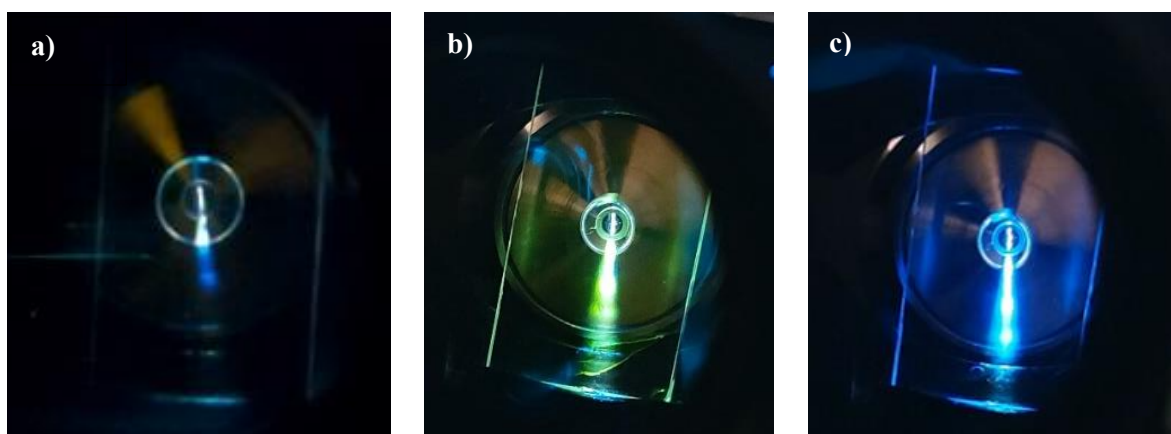


Abbildung 72: Lichtbild des Probenträgers durch den Notchfilter 405/488 nm. **a)** HPDE-APTES immobilisiert in Acetonitril **b)** Nach Zugabe von Verkade Base **c)** Nach Zugabe von TBDPS-Cl.

Die Farbkanäle für Einzelmolekülexperimente wurden anhand der Spektren von geschützter und deprotonierter Form von HPDE-APTES so ausgewählt, dass die Fluoreszenz der beteiligten Reaktanden möglichst quantitativ und selektiv abgedeckt wurde. Entsprechend der beobachteten Fluoreszenzfarben wurden sie mit “grünem” ($\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}600\text{ nm}$) und “blauem” ($\lambda_{\text{det}} = 417\text{-}477\text{ nm}$) Kanal notiert. Dementsprechend konnten Einzelmoleküle im grünen Kanal der Basenform (RO^-) und Einzelmoleküle im blauen Kanal der geschützten sowie protonierten Form ($\text{RO-TBDPS/RO-TBDMS/ROH}$) zugeordnet werden.

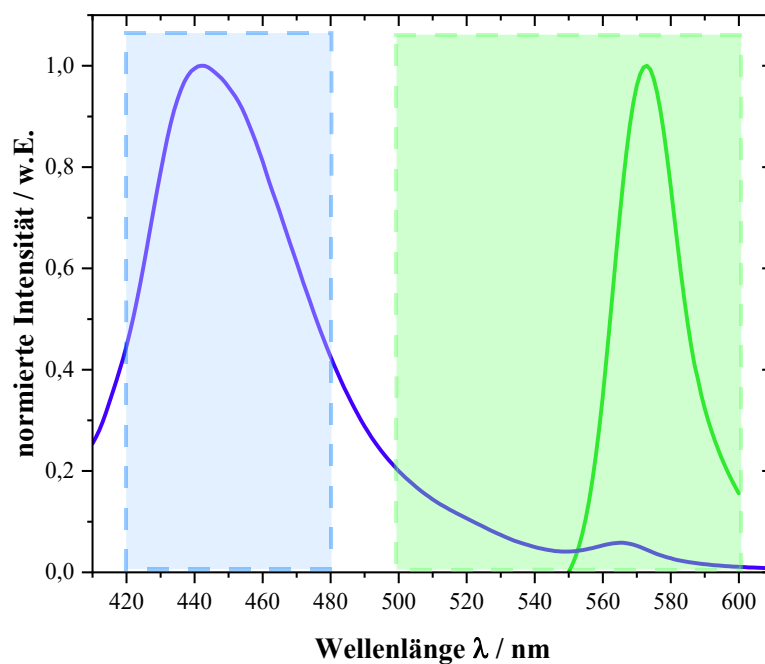


Abbildung 73: Darstellung der Filterspektren in Pseudofarben relativ zur Lage der Emissionsspektren von geschützter (blau) und deprotonierter (grün) Form von HPDE-APTES.

3.2.3 Silylschutzgruppenchemie im o-TIRF mit HPDE-APTES

Detektion und Charakterisierung von HPDE-APTES auf dem Einzelmolekülniveau

Abbildung 74 zeigt exemplarisch eine Aufnahme von immobilisiertem HPDE-APTES im o-TIRF in den beiden Detektionskanälen unter basischen Bedingungen sowie nach Zugabe von Silylierungsmittel. Intensitätsspur, die einen charakteristischen Abfall der Fluoreszenzintensität zeigen, belegen das Vorliegen einzelner Moleküle sowohl im grünen als auch blauen Kanal (Abbildung 75).

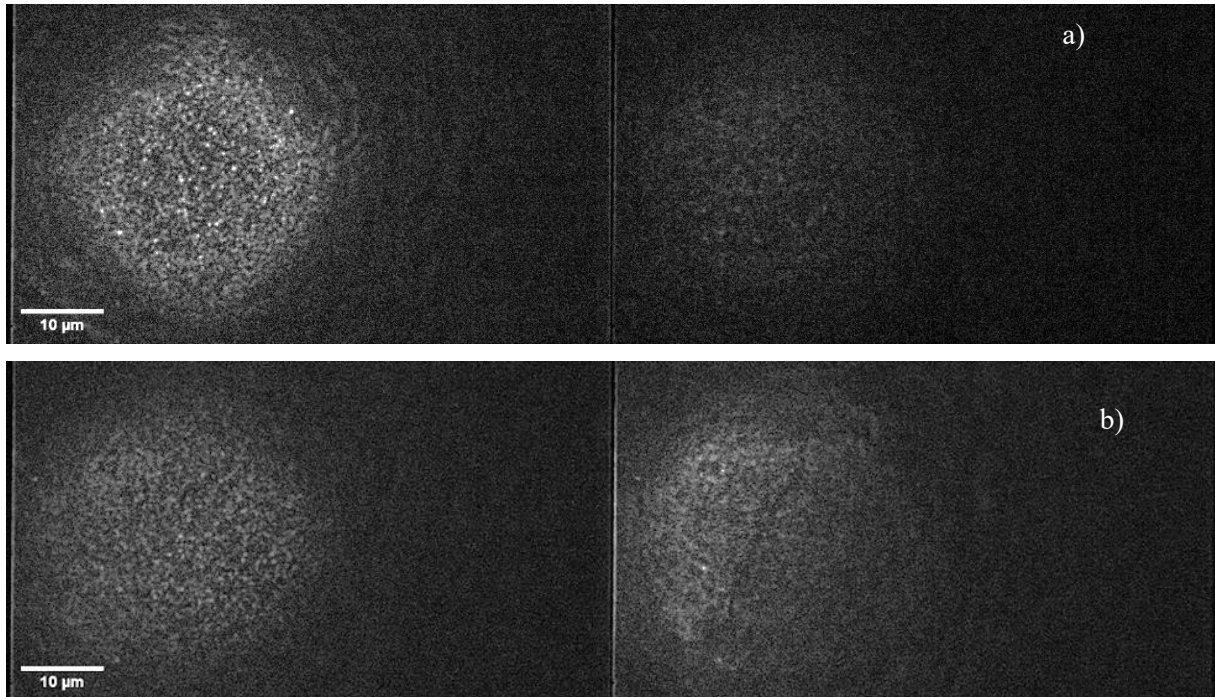


Abbildung 74: o-TIRF Aufnahme von immobilisiertem HPDE-APTES. **a)** In ACN/NaH. **b)** Nach Zugabe von TBDPS-Cl. $\lambda_{\text{ex}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Belichtungszeit 0.3 s. Grüner Detektionskanal links, blauer Detektionskanal rechts.

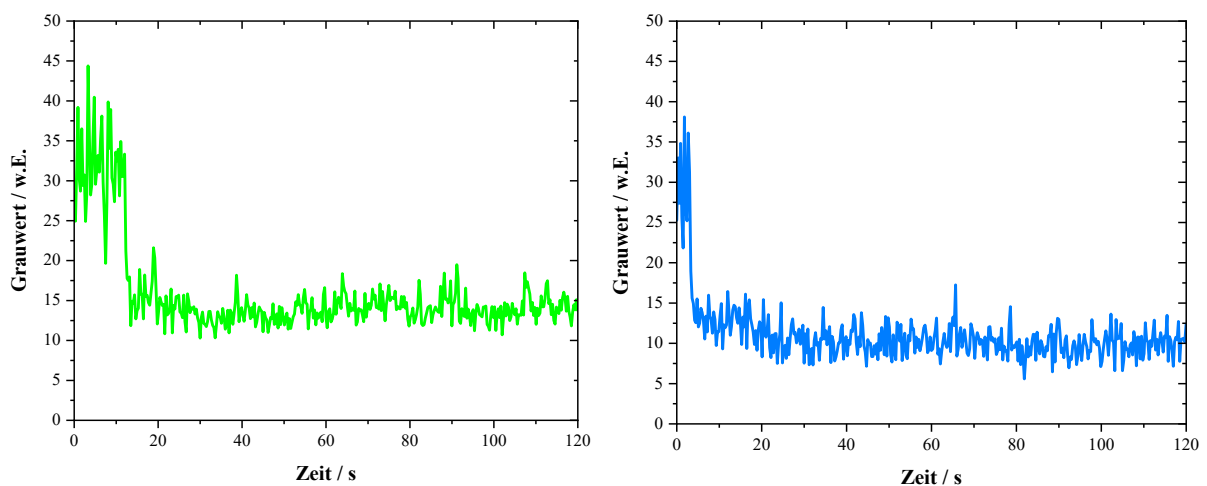


Abbildung 75: Einzelmolekülzeitspuren von HPDE-APTES mit charakteristischem Abfall der Intensität nach Photobleichen. Extrahiert aus Abbildung 74 für den grünen und blauen Kanal.

3 Ergebnisse & Diskussion

Photophysikalische Parameter konnten für HPDE-APTES aus stationären Aufnahmen in Acetonitril bestimmt werden. Für fünf über die ROI verteilte Moleküle wurde die laterale, experimentelle Auflösung aus der Halbwertsbreite bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 76. Die erhaltene Auflösung von 313 nm bzw. 247 nm liegt, unter Beachtung der Fehlergrenzen, in gutem Einklang mit dem theoretisch berechneten Wert. Dieser liegt nach Gleichung (15) für die Emission der deprotonierten Spezies von HPDE-APTES bei 242 nm.

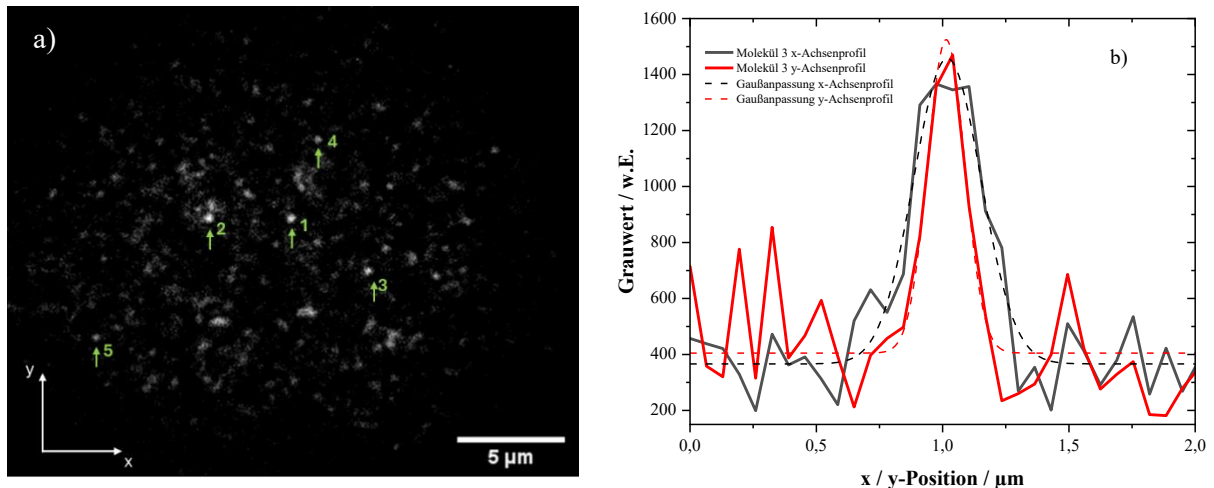


Abbildung 76: a) Aufnahme von HPDE-APTES im o-TIRF mit Nummerierung der ausgewählten Moleküle zur Bestimmung der Halbwertsbreite im grünen Detektionskanal. b) Gaußanpassung von Molekül Nr. 3 in x- und y-Richtung. $\lambda_{exc} = 405/488$ nm ($P = 1/1$ mW).

Tabelle 13: Erhaltene FWHM-Werte für Moleküle 1 bis 5 aus Gaußanpassungen sowie daraus berechnete mittlere Auflösung und Standardabweichung.

Molekül Nr.	FWHM / nm	FWHM / nm
	x-Achse	y-Achse
1	381	267
2	334	318
3	313	173
4	264	261
5	273	214
MW	313 ± 48	247 ± 55

Das SNR wurde jeweils aus fünf Einzelmolekülspuren im grünen (RO^-) und im blauen Kanal (ROH) bestimmt. Aus den in Tabelle 14 aufgeführten Werten geht hervor, dass das SNR im blauen Kanal etwas niedriger liegt, was durch den kleineren Wellenlängenbereich und höhere Belastung durch Streulicht und Untergrundfluoreszenz, bedingt durch Verwendung der 405 nm Anregungswellenlänge, erklärt werden kann.

Tabelle 14: Signal-zu-Rauschen-Verhältnis im o-TIRF für HPDE-APTES, getrennt nach Detektionskanal.

Detektionskanal	SNR	Standardabweichung
Grüner Kanal $\lambda_{det} = 500-600$	14.3	± 2.8
Blauer Kanal $\lambda_{det} = 417-477$	8.2	± 2.8

Untersuchung der Silylierungsreaktion

Für die Untersuchung der Silylierungsreaktion auf dem Einzelmolekülniveau wurde HPDE-APTES auf Quarz-Deckgläsern immobilisiert und unter o-TIRF Bedingungen bei den diskutierten Anregungs- und Detektionsbedingungen in Acetonitril untersucht. Zur Zugabe der Reagenzien wurden verschiedene Strategien erprobt, unter anderem die Zugabe von Reagenzien über mikrofluidische Systeme in Kombination mit Peristaltikpumpe oder Spritzen. Diese erwiesen sich jedoch vor allem wegen Problemen bei der Abdichtung und Koordination des Zeitpunkts, an dem die Reagenzien den Probenträger erreichen, als nachteilig. Die Zugabe erfolgte daher über Pipetten direkt auf den Probenträger. Die Reaktivität des immobilisierten Farbstoffs im Einzelmolekülexperiment konnte validiert werden, indem nach Zugabe von Reagenzien der Intensitätsverlauf über die gesamte ROI im blauen sowie grünen Farbkanal aufgenommen wurde. Abbildung 77 zeigt die normierten Intensitätsverläufe bei Zugabe von TBDPS-Cl Lösung (600 μ M). Nach der Zugabe zum Zeitpunkt $t = 2$ s steigt die Fluoreszenz im blauen Farbkanal sprunghaft an, während im grünen Farbkanal das umgekehrte Verhalten beobachtet wird. Mit langsamerer Zeitkonstante sinkt in direkter Folge die Helligkeit im blauen Kanal, während sie im grünen Kanal wieder ansteigt. Ab ca. 7 s überwiegt Photobleichen und führt zu einer Abnahme der Gesamthelligkeit. Im blauen Detektionskanal wird die Fluoreszenz der geschützten Spezies detektiert. Der instantane Anstieg der Helligkeit bei Zugabe von TBDPS-Cl lässt sich daher der Bildung der geschützten Photosäure aus der deprotonierten Form zuschreiben. Die anschließende, langsame Umkehr des Prozesses kann dagegen als Zersetzung der geschützten Spezies unter basischen Bedingungen interpretiert werden.

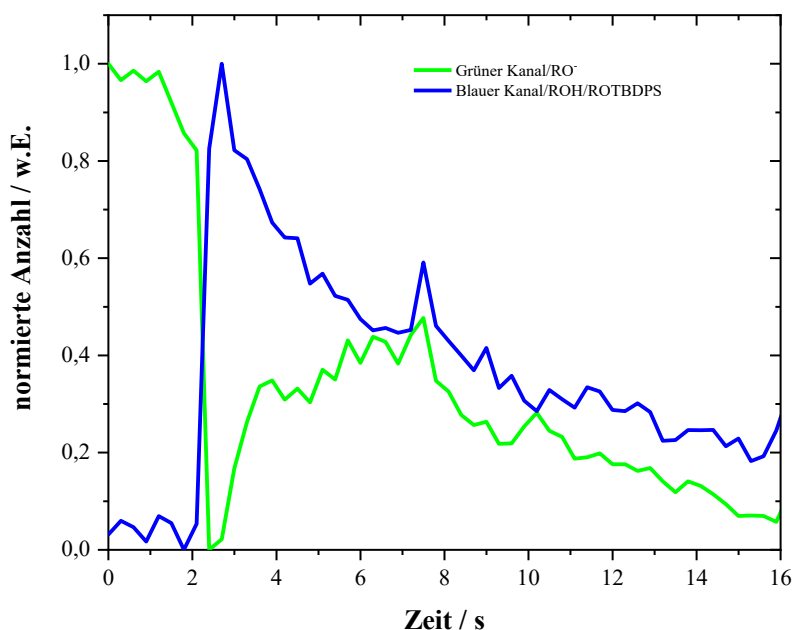


Abbildung 77: Normierter Intensitätsverlauf der beiden Detektionskanäle bei Zugabe von TBDPS-Cl zu immobilisiertem HPDE-APTES in ACN/NaH. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488$ nm ($P = 0.5/1$ mW). Zeitauflösung 0.3 s.

Die Reaktivität des immobilisierten Farbstoffs konnte auf diesem Wege nachgewiesen werden, allerdings konnten nur in wenigen Experimenten tatsächlich Einzelmolekülspektren extrahiert werden, die das erwartete Verhalten widerspiegeln. Insgesamt erwiesen sich zwei Strategien als valide.

- (1) Die Reaktion konnte auf dem Einzelmolekülniveau nachgewiesen werden, indem auf Quarzgläsern immobilisiertem HPDE-APTES die Verkade Base in Acetonitril zugesetzt wurde. Durch Zugabe von TBDPS-Cl in Acetonitril konnten 53 Einzelmolekülspektren aus drei Aufnahmen extrahiert werden, bei denen Intensitätssprünge vom grünen zum blauen Detektionskanal erkannt werden können. Dabei bestätigte sich das Verhalten aus Abbildung 77, nach dem die Umsetzung zur geschützten Spezies instantan nach Zugabe des Silylierungsmittels erfolgt.

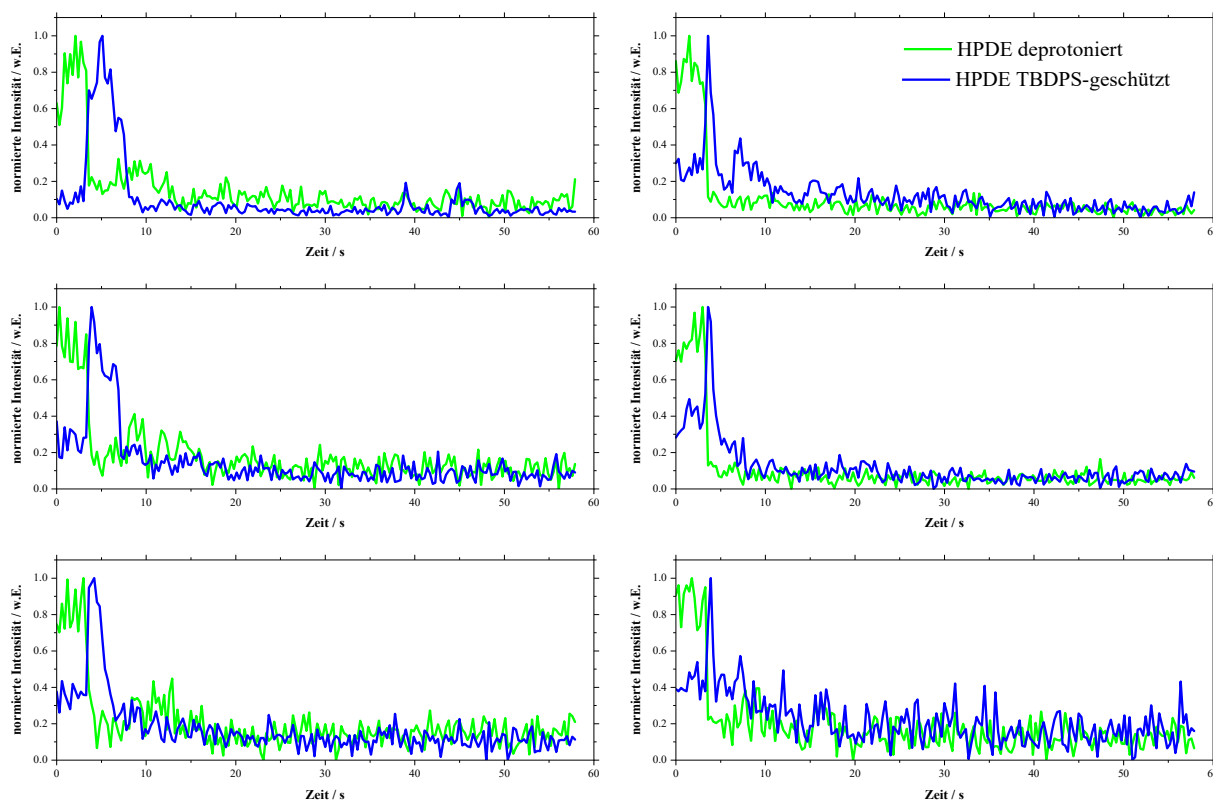


Abbildung 78: Auszug von sechs Einzelmolekülspektren aus den Experimenten mit immobilisiertem HPDE-APTES und Zugabe von Verkade Base und TBDPS-Cl in Acetonitril. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.

In einer Aufnahme konnten neun Einzelmolekülspektren extrahiert werden, deren Intensitätsverlauf sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion widerspiegelt (Abbildung 79 und Abbildung 80).

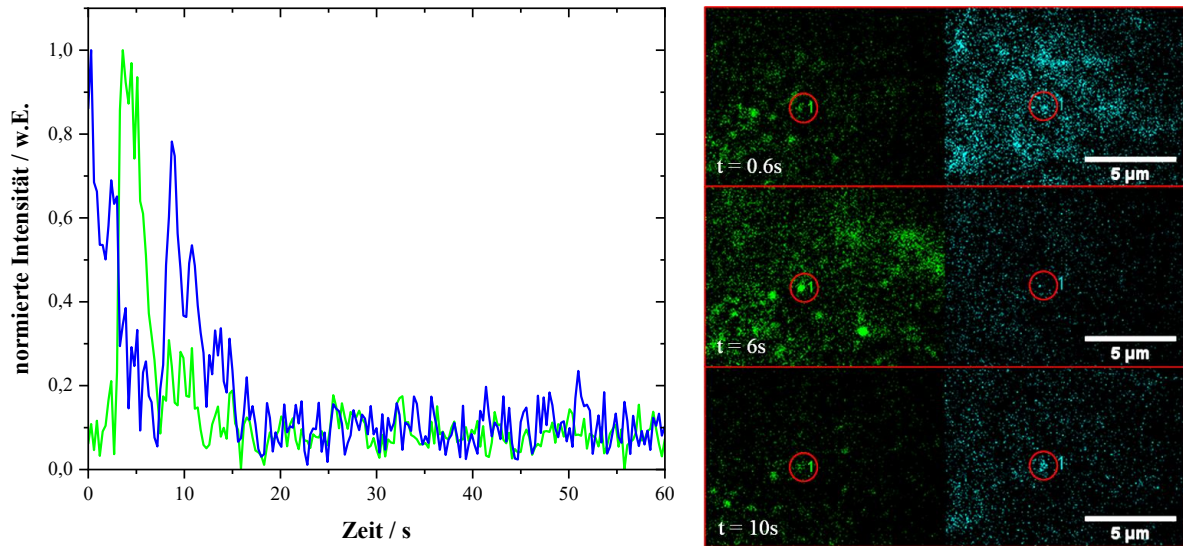


Abbildung 79: Beispiel einer Einzelmolekülspur mit zweifachem Intensitätswechsel und Aufnahme der ROI des Moleküls im o-TIRF zu charakteristischen Zeiten.

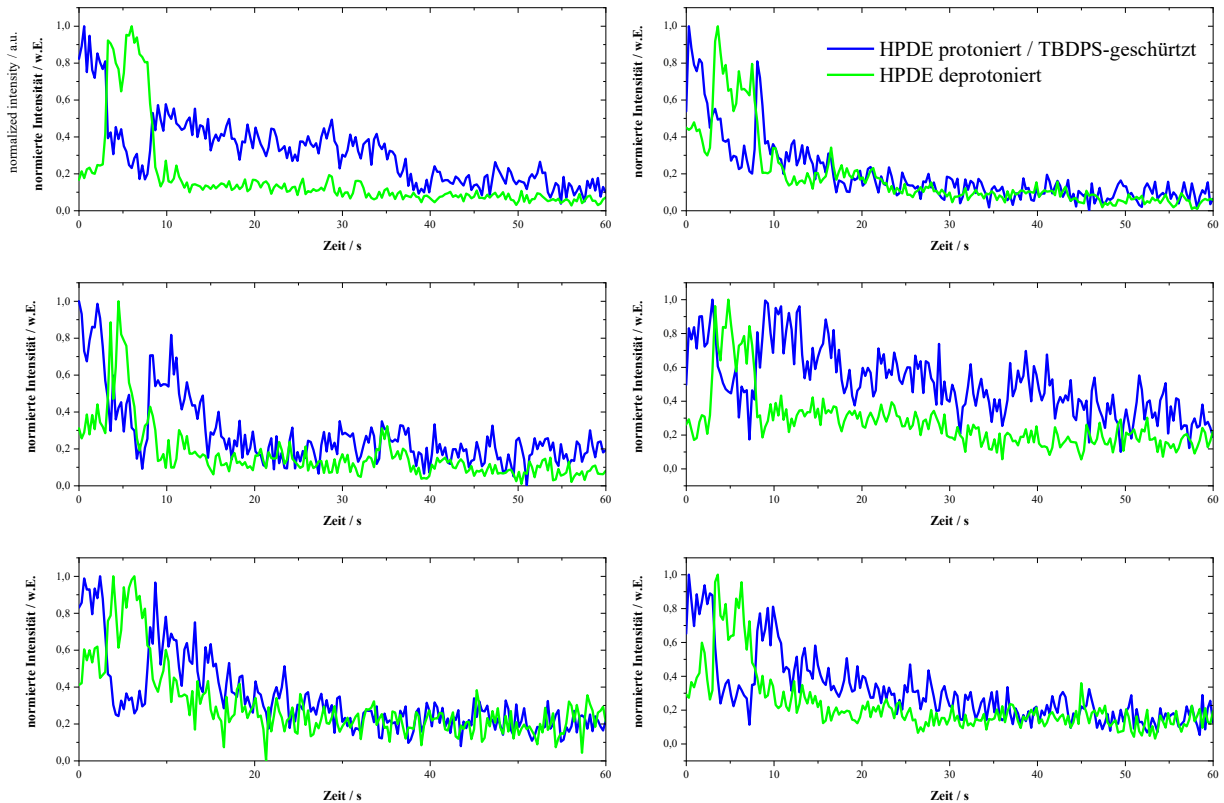


Abbildung 80: Auszug von Einzelmolekülspuren aus den Experimenten mit immobilisiertem HPDE-APTES und Zugabe von Verkade Base und TBDPS-Cl in Acetonitril. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.

- (2) Alternativ konnte mit NaH behandeltes Acetonitril für Einzelmolekülexperimente verwendet werden. Nach Zugabe von TBDPS-Cl in Lösung konnten 98 Spuren aus sechs Aufnahmen extrahiert werden, bei denen Intensitätsverläufe vom grünen zum blauen Detektionskanal erkennbar waren.

Für diesen Fall sind im Histogramm in Abbildung 82 die Zeiten bis zum Abfall des Fluoreszenzsignals im grünen Detektionskanal aufgetragen. Abbildung 82b enthält die Zeitabstände bis zum Auftauchen der Fluoreszenz im blauen Detektionskanal. Aus den Auftragungen wird deutlich, dass die Reaktion im TIRF nach Zugabe des TBDPS-Cl nahezu instantan abläuft. Für die monoexponentielle Anpassung ergibt sich eine charakteristische Bleichzeit von $1.0 \text{ s} \pm 0.2 \text{ s}$, während der Mittelwert $0.6 \text{ s} \pm 0.5 \text{ s}$ beträgt. Ein Vergleich mit den Ensemble-Messungen ist aufgrund der unterschiedlichen Einheiten der Ratenkonstanten nicht direkt möglich. Eine Reaktionskonstante zweiter Ordnung k_{ii} kann nach folgender Gleichung aus der Konzentration des Silylierungsreagenz ($[\text{TBDPS-Cl}] = 600 \mu\text{M}$) und dem Kehrwert der charakteristischen Bleichzeit τ_{exp} abgeschätzt werden^[155]. Der erhaltene Wert von $1.70 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ liegt in guter Übereinstimmung mit den Werten, die aus den Ensemble-Messungen für den Eduktverbrauch von HPTE ($k_v = 1.16 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Abbildung 69) erhalten wurden.

$$k_{ii} = \frac{k_i}{[\text{TBDPS-Cl}]_0} = \frac{1}{\tau_{\text{exp}} * [\text{TBDPS-Cl}]_0} \quad (27)$$

Es ließen sich keine Reaktivitäten über einen Zeitraum von 1.8 s nach Zugabe feststellen. Eine kleine Anzahl an Verzögerungen zwischen den Kanälen konnte detektiert werden. Deren Dauer liegt jedoch nahe an der verwendeten zeitlichen Auflösung von 0.3 s. Eine Überlagerung durch die Rauschamplitude kann nicht ausgeschlossen werden und das Auftreten eines Dunkelzustands wäre auf Basis des aufgestellten Reaktionsmechanismus aus Kapitel 2.9 nicht zu erwarten. Trotz des basischen Mediums konnten in diesem Fall keine Spuren mit anschließender Zersetzung der geschützten Spezies detektiert werden.

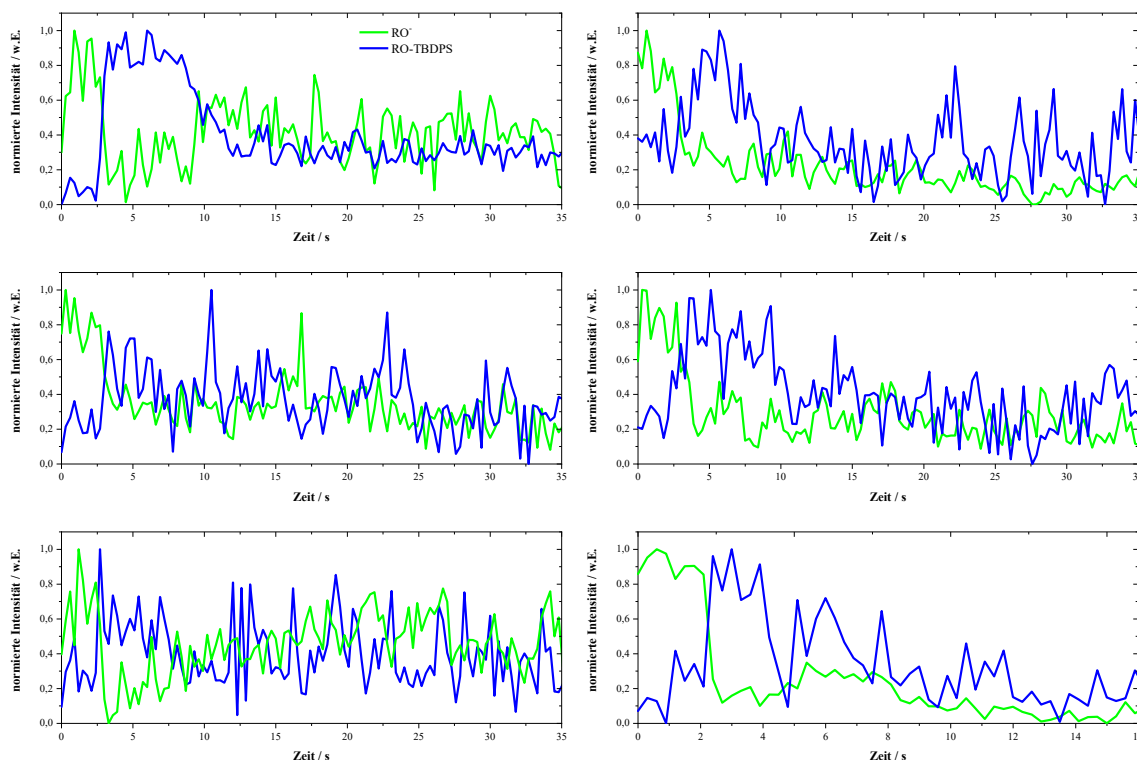


Abbildung 81: Auszug von Einzelmolekülspektren aus den Experimenten mit HPDE-APTES in Acetonitril mit NaH versetzt und Zugabe von TBDPS-Cl. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.

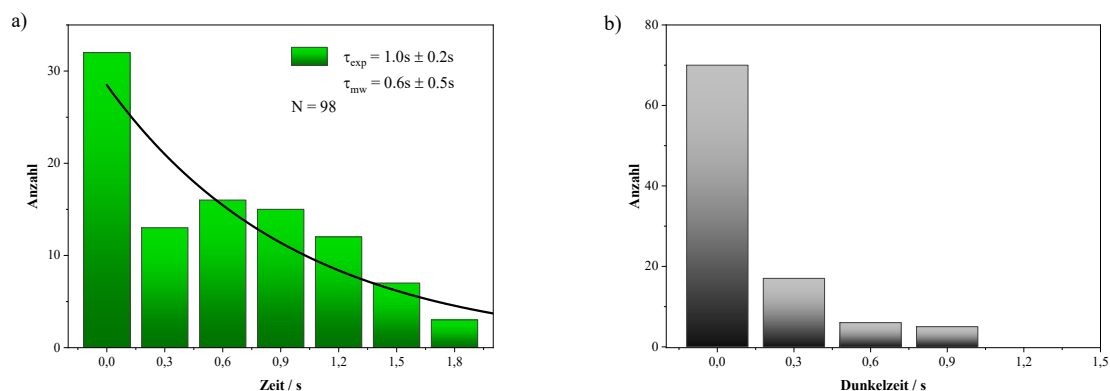


Abbildung 82: a) Auftragung der Zeiten von 98 Einzelmolekülspuren bis zum Abfall des Fluoreszenzsignals im grünen Kanal für die Versuche mit ACN/NaH und deren Anpassung. b) Histogramme der Verzögerungszeiten zwischen Abfall des Fluoreszenzsignals im grünen und Anstieg im blauen Kanal.

4 Experimenteller Teil

4.1 Spektroskopie im Ensemble

Zur Aufnahme von Absorptionsspektren wurde ein Zweistrahlphotometer (V-650, Jasco) mit einer Auflösung und Detektionsspaltbreite von 1 nm verwendet. Fluoreszenzspektren wurden mit einem Spektrofluorometer (FP-6500, Jasco) aufgenommen, wobei die Detektionsspaltbreite je nach Signalstärke und Experiment variiert wurde. Ensemblespektren von Terrylen wurden bei einer Konzentration von 50 μM in Toluol aufgenommen.

Ensemblespektren von HPTE, HPDE-Cl und HPDE-APTES wurden in mikromolaren Farbstoffkonzentrationen in Acetonitril aufgenommen. Für die Bestimmung der Reaktionskinetik wurde eine Lösung von HPTE in Acetonitril mit Verkade Superbase in äquimolaren Mengen angesetzt und die Reaktion durch Zugabe des Silylierungsmittels bei einer Konzentration aller Reaktanden von 10 μM initiiert. Für Kinetikexperimente unter Verwendung von NaH als Base wurde Acetonitril mit einer Spatelspitze NaH (90%, trocken) versetzt, geschüttelt, und zentrifugiert. Der Überstand wurde pipettiert und für das Ansetzen der Farbstofflösung verwendet. Durch Zugabe des Silylierungsmittels in äquimolare Menge (10 μM) wurde die Reaktion initiiert.

Emissionsspektren wurden für die Eduktseite (RO^-) bei $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{det}} = 450\text{-}525 \text{ nm}$ und für die Produktseite ($\text{RO-TBDPS/-TBDMS/-TMS}$) bei $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{det}} = 530\text{-}600 \text{ nm}$, im Abstand von 10 s, über eine Gesamtdauer von bis zu 30 min aufgenommen. Der Umsatz der Reaktion wurde durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums der Reaktionslösung vor und nach der Reaktion kontrolliert. Die Geschwindigkeitskonstanten für eine Reaktion 2. Ordnung wurden durch eine lineare Anpassung aus den Maxima der Emissionsspektren des Eduktverbrauchs nach Gleichung (28) und der Produktbildung nach Gleichung (29) bestimmt:

$$\frac{1}{[\text{RO}^-]_t} = k_{\text{v}}t + \frac{1}{[\text{RO}^-]_0} \quad (28)$$

$$\frac{1}{1 - [\text{RO-SiOR}'_3]_t} = k_{\text{v}}t + \frac{1}{[\text{RO-SiOR}'_3]_{\infty}} \quad (29)$$

4.2 Experimentelles zur TIRF-Mikroskopie

4.2.1 Säuberung von Probenträgern

Zur Wiederverwendung geeignete Quarzdeckgläser (QSIL oder Sico Technology) wurden mittels einer modifizierten Methode, die von Lessel et al. ^[141] für Siliziumwafer beschrieben wurde, gereinigt. Dazu wurden Teflonhalter mit Deckgläsern bestückt und über Nacht in siedende Piranhasäure ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$, Volumenverhältnis 1:3) getaucht. Die Halter wurden mit vorgereinigten Pinzetten aus der Lösung entnommen, leicht geschüttelt, um Reste der Piranhasäure zu entfernen, mit Ethanol und Wasser spektroskopischer Qualität abgespült und anschließend 30 min in ein Wasserbad eingetaucht. Das Prozedere wurde mit Aceton spektroskopischer Qualität wiederholt und die Gläser abschließend für 1 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Trocknung der Gläser mit Stickstoff konnten sie direkt für die Immobilisierung weiterverwendet oder für kurze Zeit (< 24 h) gelagert werden. Für die Lagerung wurden die Gläser in abgedichteten Teflongefäßen in Aceton spektroskopischer Qualität eingetaucht oder unter Vakuum gelagert. Menzel-Deckgläser wurden ohne weitere Reinigung verwendet und auf fluoreszierende Verunreinigungen stichprobenartig durch Aufnahme von Blindproben (siehe Anhang, Kapitel 7.1.2) kontrolliert.

4.2.2 Prismenbasierte TIRF-Mikroskopie

Mit dem in Abbildung 83 schematisch gezeigten Aufbau lassen sich TIRF-Messungen in flüssigen Medien mit passenden Brechungsindices durchführen. Verschiedene Laserlinien können einzeln oder zusammen in ein invertiertes Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) geführt werden. Für p-TIRF wurden die CW-Laser über einen Klappspiegel über eine plankonvexe Linse ($f = 50 \text{ mm}$) in ein Quarz-Prisma (Suprasil, $n = 1.46$, Melles Griot) auf die Probe geleitet. Je nach Anforderung an das Experiment konnte, durch Einstellung der Linse und Anpassung der Anregungswellenlänge die gesamte Sensorfläche von maximal $2304 \times 2304 \text{ pixel}$ ($150 \times 150 \text{ }\mu\text{m}$) beleuchtet werden. Unterhalb des Prismas wurde ein Quarzglas ($22 \times 40 \text{ mm}$, SQ2, Sico Technology) mit immobilisierter Probe auf einen Objektträger (#1.5, Menzel) gelegt, wobei $50 \text{ }\mu\text{l}$ flüssiges Medium (Wasser/Ethanol/Acetonitril) dazwischen gegeben wurden. Totalreflektion fand dabei an der Grenzfläche zwischen der Flüssigkeit und dem Quarzglas statt. Durch ein Ölobjektiv (α -Plan-FLUAR 100x, $\text{NA} = 1.45$, Zeiss) wurde das Fluoreszenzlicht durch einen dichroitischen Spiegel und einen passenden Bandpassfilter auf die Detektionskameras geleitet. Mit den verwendeten Kameras wurden Aufnahmen mit einer Dauer von 1 min bis 10 min und einer Bildfrequenz zwischen 1 s^{-1} und 10 s^{-1} angefertigt. Die Detektion von unterschiedlichen Fluoreszenzfarben konnte durch Aufspaltung des Detektionsstrahlengangs mit einem Strahlteiler (Optosplit III, Cairn Research) realisiert werden. Die Kalibrierung der Farbkanäle erfolgte anhand immobilisierter Fluoreszenzbeads (Fluoresbrite™ Plain YG 0.1 Microspheres, 2.64% Solids-Latex, Polyscience Inc.) mit breiter Emissionsbande von 450-600 nm, die in allen verwendeten Farbkanälen detektiert werden konnte (siehe Anhang, Kapitel 7.1.1). Vertikale und horizontale Kalibrierung erfolgte durch Feinjustierung der Spiegel anhand des Kamerabildes im “LiveView” Modus.

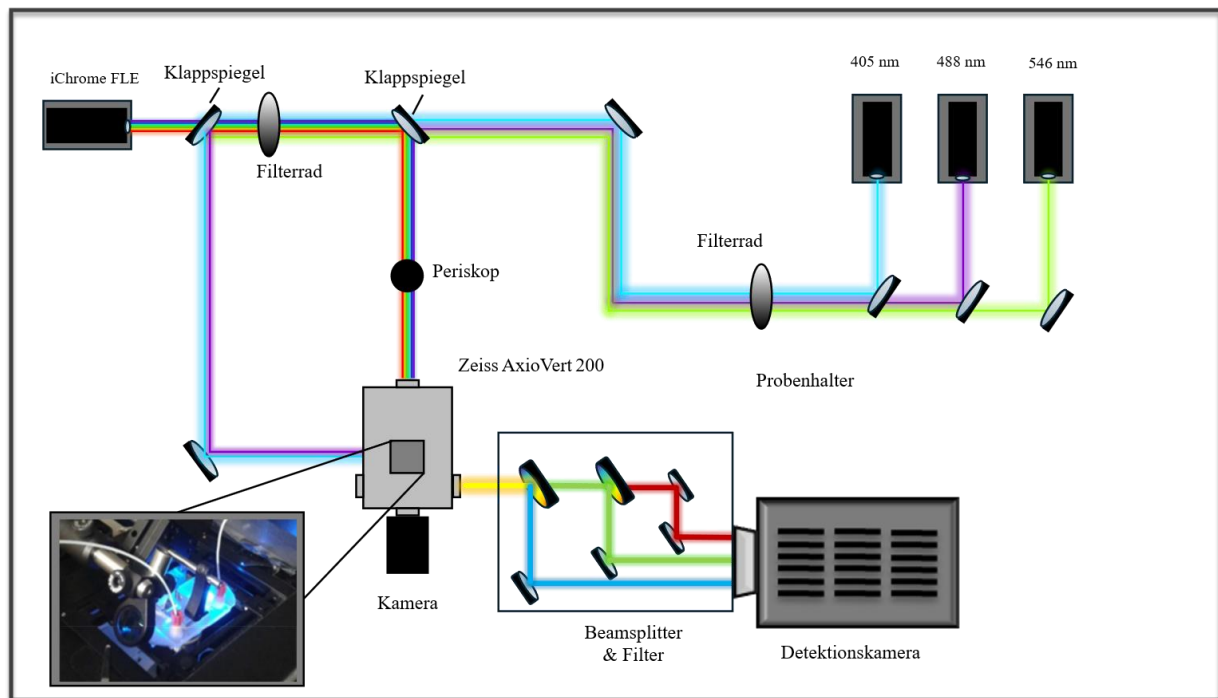


Abbildung 83: Schematischer Aufbau und Strahlengang des TIRF-Mikroskops.

4.2.3 Objektivbasierte TIRF-Mikroskopie

Zur Durchführung von Messungen mit Anregung der Probe durch das Objektiv wurde der in Abbildung 83 gezeigte Aufbau modifiziert. TIRF-Mikroskopie wurde durch das Einbringen einer achromatischen Doubletlinse ($f = 400$ mm, ThorLabs) ermöglicht, die auf einer dreidimensionalen Verschiebepattform sitzt. Die Brennweite wurde so gewählt, dass die hintere Fokalebene des Objektivs (α -Plan-FLUAR 100x, NA = 1.45, Zeiss) im Brennpunkt der Linse liegt. Ein zusätzlicher Stahlaufweiter (5-fach, GEB05-A, ThorLabs) vor der Linse ermöglichte, abhängig vom verwendeten Laser, das Ausleuchten einer Fläche von bis zu 50×50 μm . In neutraler Position, ohne Strahlablenkung, war der Aufbau so auch für Epifluoreszenzmikroskopie nutzbar. Abhängig vom Experiment wurden Deckgläser (#1.5, Menzel) oder Quarzgläser (Quarzglasrundscheiben, $\text{DMR} = 22.0 \pm 0.3$ mm, $d = 0.15 \pm 0.05$ mm, QSIL) als Probenträger mit immobilisiertem Farbstoff auf den Probenhalter gelegt und in den Fokus gebracht. Durch Verschieben der TIRF-Linse in x- oder y-Richtung wurde der Anregungsstrahl seitlich verschoben in das Objektiv geschickt, wodurch der Laserstrahl abgewinkelt auf die Grenzfläche oberhalb der Probe traf. Je nach Experiment bestand die Grenzfläche aus dem System Glas-Luft oder Glas-Flüssigkeit. Der Laserstrahl wurde so weit abgelenkt, bis er parallel zum Probenglas verlief und der totalreflektierte Strahl aus der rückwärtigen Öffnung des Mikroskops austrat. Die Fluoreszenz der Probe wurde vom Objektiv eingesammelt und durch dichroitische Filter, Notchfilter sowie passende Bandpassfilter vom Anregungslicht abgetrennt. Der Detektionsstrahlengang wurde direkt auf die Detektionskamera geleitet oder vorher durch Zwischenschaltung des Strahlteilers (Optosplit III, Cairn Research) in Farbkanäle aufgetrennt.

4.2.4 TIRF-Mikroskopie für die Photooxidation von Terrylen in *p*-Terphenyl

Probenvorbereitung von Terrylen in *p*-Terphenyl

50 µl einer nanomolaren Lösung von Terrylen in Toluol mit 0.5-1.0 mg/ml *p*-Terphenyl wurden auf ein Deckglas (Menzel, #1.5) gegeben. Für eine gleichmäßige Oberflächenverteilung wurde die Lösung für einige Sekunden auf dem Deckglas belassen, im Anschluss abtropfen gelassen und das Lösungsmittel auf einem selbst konstruierten Spin Coater bei 3000 rpm für 30 s entfernt. Die Kristallschicht war im Anschluss als feine, weiße Schicht auf der Oberfläche erkennbar. Blindproben von *p*-Terphenyl wurden durch Spincoating der *p*-Terphenyl-Lösung ohne Farbstoff angefertigt und analog untersucht (siehe Anhang, Kapitel 7.1.2).

Vergleichsproben wurden angefertigt, indem Proben:

- (1) Aus der Lösung ohne Abtropfen auf Deckgläser mittels Spincoating immobilisiert wurden
- (2) Aus der Lösung bei erhöhter Temperatur (50 °C) verdampft wurden.
- (3) Aus einer Feststoffmischung im gleichen Stoffmengenverhältnis in einer Abscheidungskammer (100 ml Sublimationsapparatur S740100, Synthware) im Hochvakuum bei 80 °C Ölbadtemperatur abgeschieden wurden.

Mehrfarben o-TIRF-Mikroskopie

Die Photooxidation wurde mit dem für o-TIRF beschriebenen Aufbau untersucht. Messungen wurden sowohl mit Ein- als auch Zweifarbenanregung durchgeführt. Einfarbenanregung wurde mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Picarro, Soliton) bei einer Anregungsintensität von 0.94 kW/cm^2 und Verwendung des dichroitischen Spiegels zt 405/488 (AHF Analysentechnik) durchgeführt. Ein zusätzlicher Notch-Filter (ZET 405/488, Chroma) wurde zur Beseitigung von Streulicht verwendet. Das Fluoreszenzlicht der Probe wurde vor der sCMOS Detektionskamera (Orca Fusion, Hamamatsu) durch den Strahlteiler geleitet, der den Detektionsstrahlengang durch einen zusätzlichen Langpassfilter (zt532, AHF Analysentechnik) in zwei räumlich getrennte Farbkanäle trennte. Zusätzliche Bandpassfilter isolierten die Fluoreszenz im kurzwelligen, „blauen“ Produktkanal (525/50, AHF Analysentechnik) sowie langwelligen, „grünen“ Eduktkanal (590/70, AHF Analysentechnik). Einzelmolekülsequenzen wurden mit 0.3 s Zeitauflösung für eine Dauer von 3 min aufgenommen. Für Zweifarbenanregung wurde zusätzlich $\lambda = 546 \text{ nm}$ (Fiber Laser FL546, Guided Color Technologies) mit einer kombinierten Anregungsintensität von 1.25 kW/cm^2 dazugeschaltet. Dichroitischer Spiegel (Di01-R488/543/635, Semrock) und kurzwelliger Bandpassfilter (500/35, AHF Analysentechnik) wurden angepasst, um Streulicht durch die zusätzliche Anregungsquelle zu vermeiden. Eine Überlagerung der zuvor diskutierten elektronischen Spektren mit den Filterspektren zeigt die nächste Abbildung:

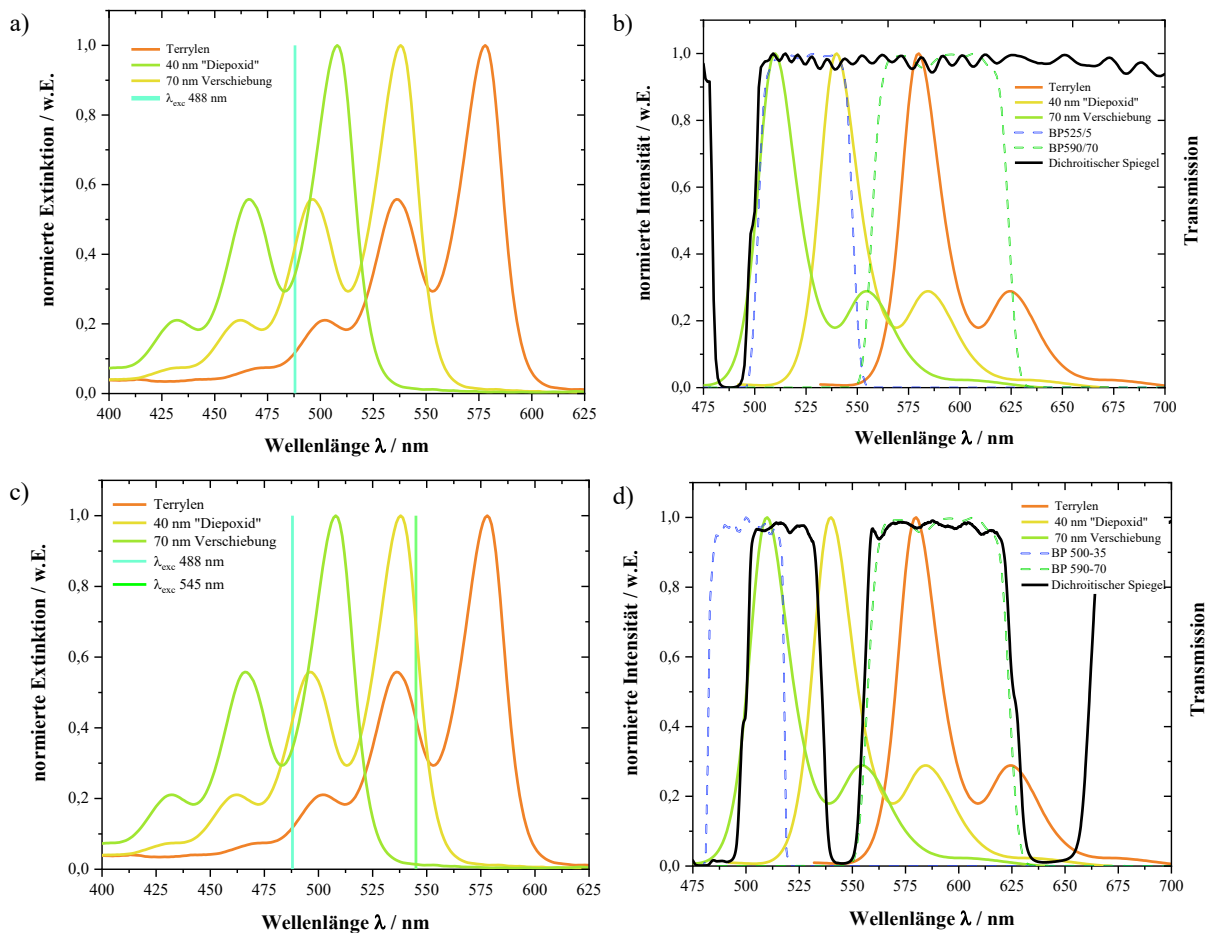


Abbildung 84: Übersicht der verwendeten Filter für die Untersuchung der Photooxidation von Terrylen in *p*-Terphenyl für die Ein-Farbenanregung a)/b) und die Zwei-Farbenanregung c)/d).

Experimente mit höherer zeitlicher Auflösung bis zu 5 ms (2000 Bilder/s) wurden am gleichen Aufbau durch Einbinden des Multifarbenlasers (iChrome FLE, Toptica Photonics) realisiert, der das Ausleuchten einer Fläche von $50 \times 50 \mu\text{m}$ mit einer Anregungsintensität von 2 kW/cm^2 bei 488 nm ermöglichte.

Spektrale o-TIRF Mikroskopie

Für die spektrale Identifizierung von Terrylen und seinen Photoprodukten in *p*-Terphenyl wurde der Aufbau des o-TIRF modifiziert, ähnlich wie von Bongiovanni et al. beschrieben [49]. Der Anregungsstrahlengang entspricht dem unter 4.2.3 beschriebenen Aufbau. Anregung erfolgte mit 488 nm bei 15 mW (Piccarro, Soliton) sowie 32 mW (iChrome FLE, Toptica Photonics) für Spektren mit höherem SNR. Nach Passieren des dichroitischen Spiegels (zt405/488, Chroma) und des Notchfilters (ZET405/488, Chroma) wurde die Fluoreszenz oberhalb von 500 nm mittels Langpassfilter abgetrennt (FELH0500, ThorLabs). Der Strahlteiler wurde durch ein Transmissionsgitter (GT25-03, 300 Rillen/mm, ThorLabs) vor der Detektionskamera (Orca Fusion C14440, Hamamatsu) ersetzt, sodass die Beugung der nullten und ersten Ordnung auf dem Sensor abgebildet wurde. Die beiden Beugungsordnungen waren daraufhin als getrennte Detektionskanäle detektierbar (Abbildung 85).



Abbildung 85: Sichtfeld im spektralen o-TIRF.

Dabei enthielt der linke, räumliche Bereich die orts aufgelösten, beugungs limitierten Emissionsmuster von Terrylen, während der rechte, spektrale Bereich die wellenlängenabhängige, horizontale Intensitätsverteilung des entsprechenden Moleküls darstellte. Für höhere SNR wurde die Belichtungszeit in den aufgenommenen Bildsequenzen auf mindestens 0.5 s erhöht. Weiterhin wurde die Konzentration von Terrylen um eine Größenordnung, im Vergleich zu Experimenten mit Farbfiltren, verringert, um Überlagerungen in der horizontalen Achse zu minimieren. Für die Kalibrierung wurden mehrfarbig markierte Mikrosphären (TetraSpeck-Mikrosphären, Anregungs/Emissionsmaximum 360/430 nm (blau), 505/515 nm (grün), 560/580 nm (orange) und 660/680 nm (dunkelrot), 0.1 µm, ThermoFisher Scientific) immobilisiert und im spektralen o-TIRF vermessen.

4.2.5 TIRF-Mikroskopie für Photosäuren als dual-emissive Sonden

Probenvorbereitung von HPDE-APTES

Die Immobilisierungsstrategie orientierte sich an einer bereits veröffentlichten Methodik für das gleiche Farbstoffsystem ^[226]. Vorgereinigte Quarzgläser ($d = 0.15 \pm 0.05$ mm, QSIL) wurden im ersten Schritt mit einer inerten Passivierungsschicht funktionalisiert. Dazu wurden die Gläser für 30 min in eine Lösung von 0.1 Vol.-% *n*-Octyltriethoxysilan (97 %) in Chloroform (>99.8%, HPLC grade) getaucht, die mit 2 Vol.-% Essigsäure (99.8%, anhydrous) versetzt wurde. Die Gläser wurden im Anschluss aus der Lösung genommen, mit Aceton und Chloroform gespült und für 30 min in eine nanomolare Lösung des Farbstoffs HPDE-APTES in Chloroform (>99.8%, HPLC grade) getaucht, die mit 2 Vol.-% Essigsäure (99.8%, anhydrous) versetzt wurde. HPDE-APTES wurde hergestellt, indem in einem Eppendorf Reaktionsgefäß unter Stickstoff 0.1 mg HPDE-Cl in 1 ml N,N-Dimethylformamid (>99.8% ü. Molsieb) gelöst wurden. Die Lösung wurde mit 10 µl Triethylamin (puriss. p.a., ≥99.5%) und 10 µl APTES (99%) versetzt und das abgedichtete Reaktionsgefäß 15 min geschüttelt. Nach Behandlung im Ultraschallbad für 5 min wurde die Reaktionslösung ohne weitere Aufreinigung im Immobilisierungsschema verwendet.

Nach erneuter Spülung der Gläser wurden diese unter Vakuum für maximal 24 h gelagert oder sofort weiterverwendet. Blindproben wurden zur Kontrolle der Reinheit nach der Reinigung, nach der Immobilisierung der Passivierungsschicht sowie vom Lösungsmittel für jedes Experiment aufgenommen (siehe Anhang, Kapitel 7.1.3). Die verwendeten Silane wurden vor der Verwendung bei 20 mbar und 120 °C Ölbadtemperatur destilliert.

Mehrfarben o-TIRF Mikroskopie

Die Untersuchung der Schutzgruppenchemie an HPDE-APTES wurde mit dem für o-TIRF beschriebenen Aufbau untersucht. Messungen wurden mit Zweifarbenanregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Picarro, Soliton) bei 1 mW Ausgangsleistung und $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ (Cube Diode Laser System, Coherent) bei 500 μW Ausgangsleistung und Verwendung des dichroitischen Spiegels (zt405/488, AHF Analystechnik) durchgeführt. Ein zusätzlicher Notch-Filter (ZET405/488, Chroma) wurde zur Eliminierung von Streulicht eingesetzt. Das Fluoreszenzlicht der Probe wurde vor der sCMOS Detektionskamera (Orca Fusion, Hamamatsu) durch den Strahlteiler geleitet, der den Detektionsstrahlengang durch einen zusätzlichen dichroitischen Filter (SEM-FF509-FDi01, Semrock) in zwei räumlich getrennte Farbkanäle trennte. Diese stellten, entsprechend den Fluoreszenzfarben, einen kurzwelligen, „blauen“ Produktkanal und einen langwelligen, „grünen“ Eduktkanal dar. Zusätzliche Bandpassfilter isolierten die Fluoreszenz in den jeweiligen Kanälen (Blau: BP 447/60 Semrock; Grün: BP 550/100, Edmund Optics). Einzelmolekülsequenzen wurden mit 0.3 s Zeitauflösung von einer ROI von $30 \times 30 \mu\text{m}$ und einer kombinierten Anregungsintensität von etwa 170 W/cm^2 aufgenommen. Eine Überlagerung der zuvor diskutierten elektronischen Spektren mit den Filterspektren zeigt Abbildung 86.

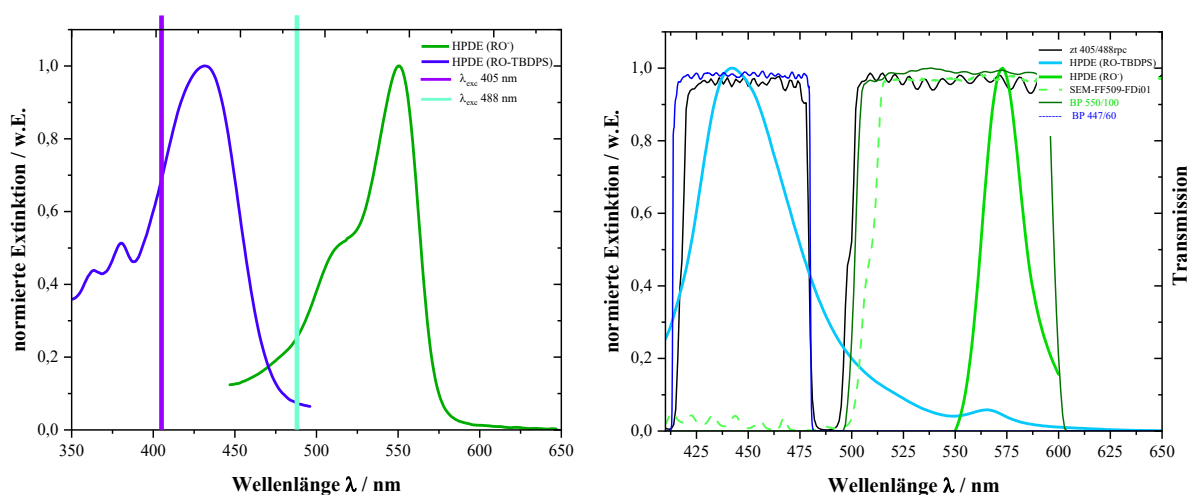


Abbildung 86: Übersicht der verwendeten Anregungslinien und Filter für die Untersuchung der Schutzgruppenchemie von HPDE-APTES.

Die Reaktionsverfolgung wurde durchgeführt, indem die beschichteten Probenträger in einer bereits für FCS-Studien etablierten Reaktionskammer^[35] (Abbildung 87) untersucht wurden. Diese erlaubte die Zugabe von Reagenzien in einem abgedichteten Reaktionsgefäß. Nach Starten der Aufnahme wurden diese mit Micropipetten zugegeben. Für Experimente mit der Verkade Base wurden die Probengläser in 500 μl trockenem Acetonitril vorgelegt und 20 μl einer Lösung der Verkade Base (5 mM) in Acetonitril dazugegeben. Durch Zugabe von 20 μl einer TBDPS-Cl-Lösung (600 μM) in Acetonitril wurde die Reaktion initiiert. Für Experimente mit NaH als Base wurden Probengläser mit 500 μl Acetonitril/NaH (siehe Kapitel 4.1) vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 20 μl TBDPS-Cl-Lösung (600 μM) in Acetonitril initiiert.

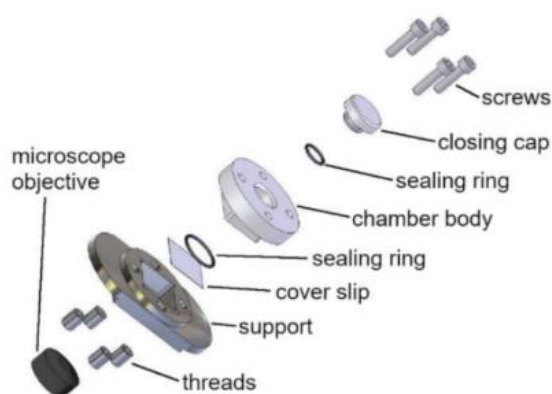


Abbildung 87: Schematischer Aufbau der verwendeten Reaktionskammer. Entnommen aus [35].

4.3 Extraktion, Verarbeitung und Auswertung von Daten

4.3.1 Allgemeine Vorgehensweise

Verarbeitung von Mikroskopieaufnahmen

Einzelbilder und Bildsequenzen wurden für die TIRF-Mikroskopie von der Kamerasoftware (HoKaWo, Hamamatsu) als Bilddateien (.tiff-Format) gespeichert. Zur Verarbeitung der Daten und Extraktion der Grafiken (.png-Format) und Einzelmoleküldaten (.txt-Format) wurde ImageJ (Version Fiji ^[237], Open Source, NIH) verwendet. Im ersten Schritt wurde dazu der Untergrund der Aufnahmen (Rolling Ball Radius 10-50 Pixel) entfernt. Zeitspuren und Intensitätsprofile wurden in der Software durch Markierung der ROI und die Werkzeuge „*plot z-axis profile*“ und „*plot profile*“ extrahiert. Über die Funktion „*Z-project*“ wurden gemittelte Aufnahmen für die jeweils definierte Anzahl an Einzelaufnahmen erstellt. Charakterisierung von Blindproben und Bestimmung von Belegungsdichten erfolgte ebenfalls in Image J über die Funktion „*find maxima*“. Damit konnte Anzahl und Position von Signalquellen oberhalb eines festgelegten Grenzwerts der Grauwerte bestimmt werden. Zur automatischen Analyse und Extraktion von Einzelmolekülspuren und Umsetzungen für die Untersuchung der Schutzgruppenchemie auf Einzelmolekülebene wurde die Software iSMS (Open Source, Single-Molecule Biophotonics Laboratory, Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Aarhus University, Dänemark) eingesetzt. Zur Auftragung, Darstellung und Anpassung von Daten wurde Origin 2022b (OriginLab) verwendet.

Bestimmung der lateralen Auflösung

Die Bestimmung der Auflösung wurde als Mittelwert der Halbwertsbreite mehrerer Moleküle durch Anpassung der Intensitätsprofile in x- und y-Richtung erhalten. Dabei ergibt sich die Kalibrierung der Pixel aus der Pixelgröße der sCMOS Kamera (6.5 µm) und der Vergrößerung des Objektivs (100x). Für die Anpassung wurde die Gaußfunktion aus Gleichung (30) verwendet:

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}} \quad (30)$$

$$\text{mit: } w = FWHM/\sqrt{\ln(4)}$$

Bestimmung des Signal-zu-Rauschen Verhältniss

Das SNR wurde aus dem Verhältnis der mittleren Signalstärke zur Stärke des mittleren Rauschpegels bestimmt. Dazu wurde jeweils für das Signal, vor und nach einem Bleichschritt, die Basislinie der jeweiligen Einzelmolekülzeitspuren mit der Funktion „*Peaks und Basislinie*“ in OriginPro bestimmt. Das Signal wurde aus der Differenz der beiden Basislinien gebildet. Die mittlere Rauschamplitude wurde aus dem Untergrundsignal gebildet, indem die Maxima der Zeitspur nach dem Bleichschritt über die Funktion „*Peaks und Basislinie*“ extrahiert und gemittelt wurden.

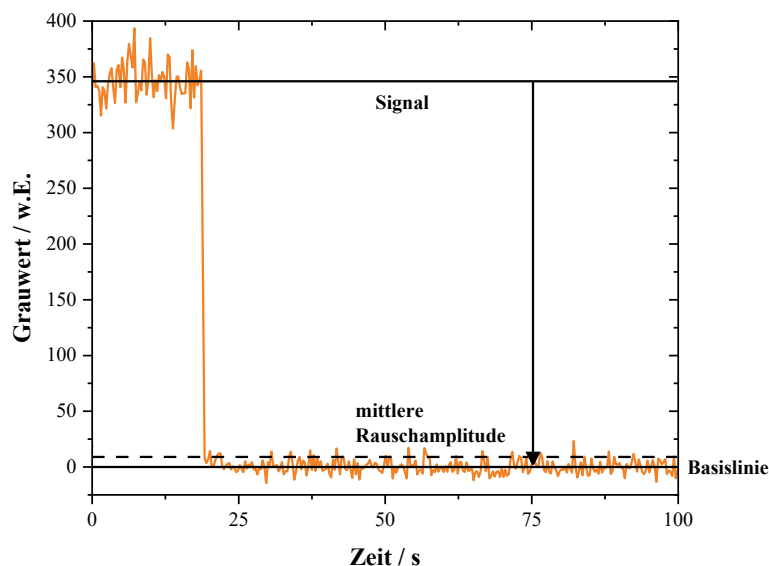


Abbildung 88: Zeitspur eines Einzelmoleküls und daraus ermittelte Parameter zur Bestimmung des SNR.

4.3.2 Datenverarbeitung zur Photooxidation von Terrylen in *p*-Terphenyl

Extraktion von Einzelmolekülspuren

Nach Entfernung des Hintergrunds wurden die Bildsequenzen manuell auf auftauchende Moleküle im „blauen“ Produktkanal abgesucht, da für Terrylen keine automatische Analyse mit iSMS gelang. Die Analyse wurde auf Moleküle mit „Doughnut“-Emissionsmuster beschränkt. Zeitspuren vom Produktkanal sowie Eduktkanal wurden von einer ROI von 16x16 Pixeln um das Molekül extrahiert und den Kategorien „OSPB“, „TSPB“ und „Sonstige“ zugeordnet. Die exemplarisch gezeigten Zeitspuren und Aufnahmen in der Arbeit wurden normiert und mit Pseudofarben codiert (Produktkanal „blau“, Eduktkanal „grün“). Die Verweilzeiten der Moleküle in den jeweiligen Zuständen (Δt_1 , Δt_2 , Δt_{dark} und Δt_{sec}) wurden ausgelesen und in Histogrammen aufgetragen, deren minimale Containerbreite durch die Bildfrequenz der Kamera von 0.3 s vorgegeben war. Zu Darstellungszwecken wurden die Histogramme mit größeren Containerbreiten im Ergebnisteil aufgezeigt. Zur Anpassung der Histogramme wurde die monoexponentielle Funktion aus Gleichung (31) gewählt. Histogramme mit der minimal möglichen Containerbreite 0.3s sind im Anhang dargestellt (Kapitel 7.1.2). Der Off-set y_0 der Funktion wurde auf 0 festgesetzt.

$$N_t = N_0 * \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + y_0 \quad (31)$$

Ermittlung der detektierten Photonenzahl

Zur Ermittlung der detektierten Photonen wurde der Grauwert der gesamten Bildsequenz mittels Geräteparameter der verwendeten sCMOS Kamera in Photonen umgewandelt. Dazu wurde über die Verrechnungsfunktion „Math“ in der Software ImageJ zunächst der gerätespezifische Off-Set von 100 Einheiten des Grauwerts abgezogen, bevor mittels Umwandlungsfaktor (0.24) die generierten Elektronen erhalten wurden. Über die mittlere Quanteneffizienz von 80% des Sensors im detektierten Wellenlängenbereich und Aufsummieren der Einzelbilder auf 1 s Belichtungszeit, wurde eine Kalibrierung der Aufnahmen in Photonen/Pixel*s erhalten. Da die Bildsequenzen eine starke Belastung durch Untergrundsignale zeigten, wurde dieser in ImageJ mittels Rolling Ball Algorithmus (Radius 10 Pixel) entfernt. Abbildung 89 zeigt exemplarisch den Vergleich des x-Achsenprofils einer Aufnahme vor und nach Entfernung des Untergrunds.

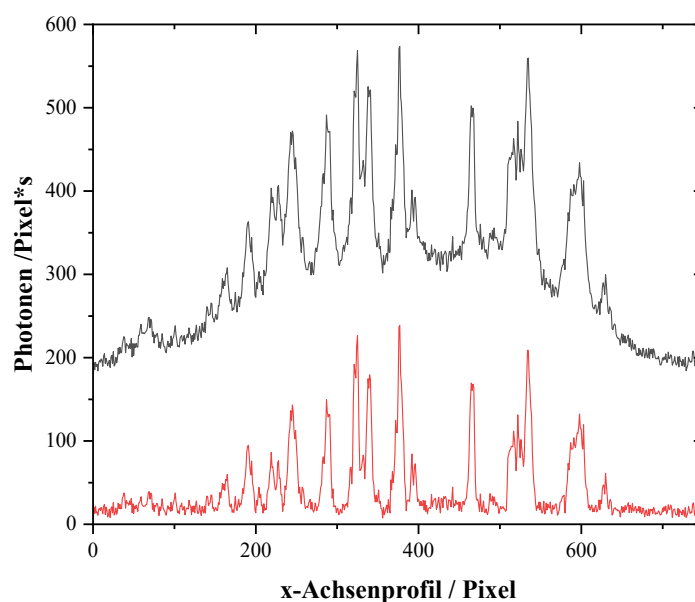


Abbildung 89: Horizontales Linienprofil einer Gesamtaufnahme von Terrylen in *p*-Terphenyl vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) der Untergrundkorrektur.

Die Emissionsrate der Moleküle wurde durch Integration der Pixelwerte einer ROI von 16x16 Pixeln durch die Funktion „Measure“ in ImageJ erhalten. Eine finale Korrektur erfolgte durch Subtraktion der Dunkelzählrate, die für jeden Farbkanal durch Integration einer „dunklen“ ROI mit 16x16 Pixel erhalten wurde.

Bestimmung und Analyse von Intensitätsverhältnissen

Zur Bestimmung der Intensitätsverhältnisse wurden die Einzelmolekülspektren mit identifiziertem TSPB-Verhalten für die Anregung mit 488 nm (0.94 oder 2.00 kW/cm²) und 488/546 nm (1.25 kW/cm²) herangezogen. Mittels der Basislinienanalyse in OriginPro wurden die Mittelwerte der Grauwerte jeweils vor und nach der Änderung im grünen Kanal, sowie die mittleren Grauwerte im auftretenden blauen Signal ausgelesen. Die Intensitätsverhältnisse berechnen sich nach Gleichung (32) und (33). Abbildung 90 stellt die Auswertung grafisch dar.

$$R_{Grün/Grün} = \frac{\langle I \rangle_{Grün,t2}}{\langle I \rangle_{Grün,t1}} \quad (32)$$

$$R_{Blau/Grün} = \frac{\langle I \rangle_{Blau}}{\langle I \rangle_{Grün,t2}} \quad (33)$$

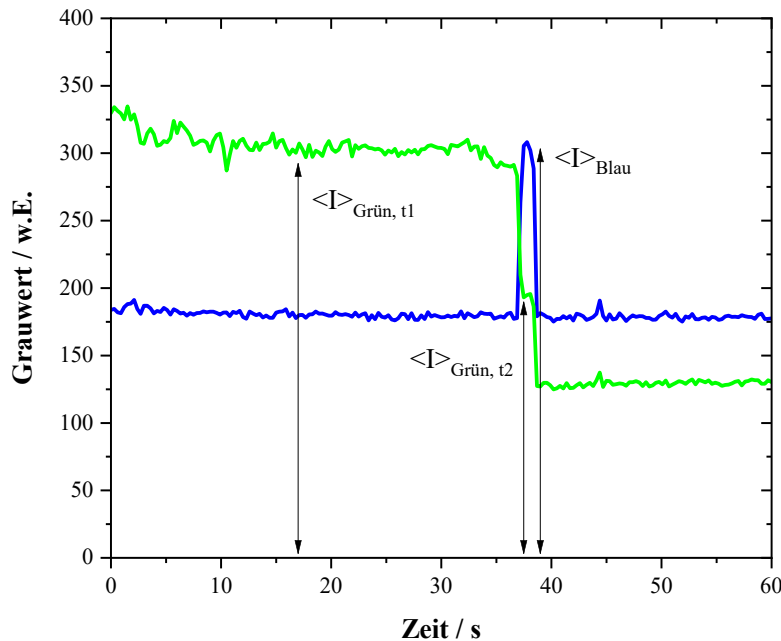


Abbildung 90: Auslesen der Intensitätsverhältnisse zur Bildung der Verhältnisse aus Einzelmolekülspektren.

Zur Analyse der Gruppenzugehörigkeiten wurden die Daten mittels einer multivariaten Analyse zu Clustern zusammengefasst. Dazu wurde eine Clusterzentrenanalyse mit einem K-Means-Algorithmus mit der Statistikfunktion „*Multivariate Analyse – K-Means-Clusteranalyse*“ in OriginPro durchgeführt. Bei dieser Methode werden Messpunkte aus einer Beobachtung durch eine Anzahl K von Clustern klassifiziert und der Algorithmus ordnet Messpunkte dem nächstgelegenen Cluster-Zentrum zu. Die Position des Mittelpunktes wird nach jedem Hinzufügen eines Falles aktualisiert. Nach Zuordnung aller Messpunkte erfolgt die Iteration des Prozesses bis zur Konvergenz einer zuvor spezifizierten Lösung. Anschließend werden alle Messpunkte klassifiziert, indem sie dem nächstgelegenen Cluster-Zentrum zugeordnet werden^[73]. Durch die begründete Annahme, dass durch die vorliegenden Filterkombinationen zwei Fraktionen an Photoprodukten detektiert werden, wurde die Anzahl der Cluster auf zwei festgelegt und die Clusterzentren anhand von zehn Iterationen berechnet. Zum Vergleich wurden Analysen mit drei und vier Clusterzentren durchgeführt und im Anhang dargestellt.

Kalibrierung und Verarbeitung von Einzelmolekülspektren

Aus den TIRF-Aufnahmen der Mikrosphären konnten die Pixelabstände Δx aus Abbildung 91a erhalten werden, die den Abstand zwischen Punktsignal im räumlichen Bereich und Emissionsmaximum der Farbstoffe im Wellenlängenbereich darstellen. In Kombination mit den, aus Ensemblesmessungen erhaltenen, Emissionsmaxima konnte die in Abbildung 91b abgebildete Kalibriergerade bestimmt werden. Diese erlaubt die Transformation von Pixelabständen auf die Wellenlängenskala und wurde zur Kalibrierung der Einzelmolekülspektren von Terrylen und den Photoprodukten verwendet. Für Spektren aus Untersuchungen zur Photooxidation mit 488 nm bei $P = 15$ mW wurde eine zusätzliche Glättung mit der Signalverarbeitungsfunktion in OriginPro durchgeführt (20 Punkte, Methode des gleitenden Durchschnitts). Abbildung 92 zeigt beispielhaft die Extraktion und Transformation eines Einzelmolekülspektrums von Terrylen.

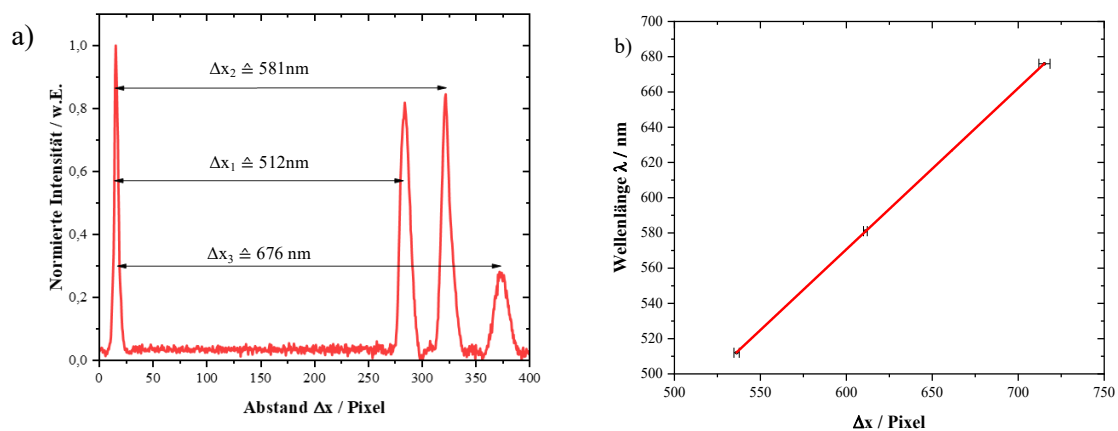


Abbildung 91: a) Bestimmung der Messpunkte als Distanz in Pixeln zu den Hauptmaxima der TetraSpek-Partikel. b) erhaltene Kalibriergerade mit der Funktion $y = 0.916(\pm 0.003) \cdot \Delta x + 21(\pm 2)$.

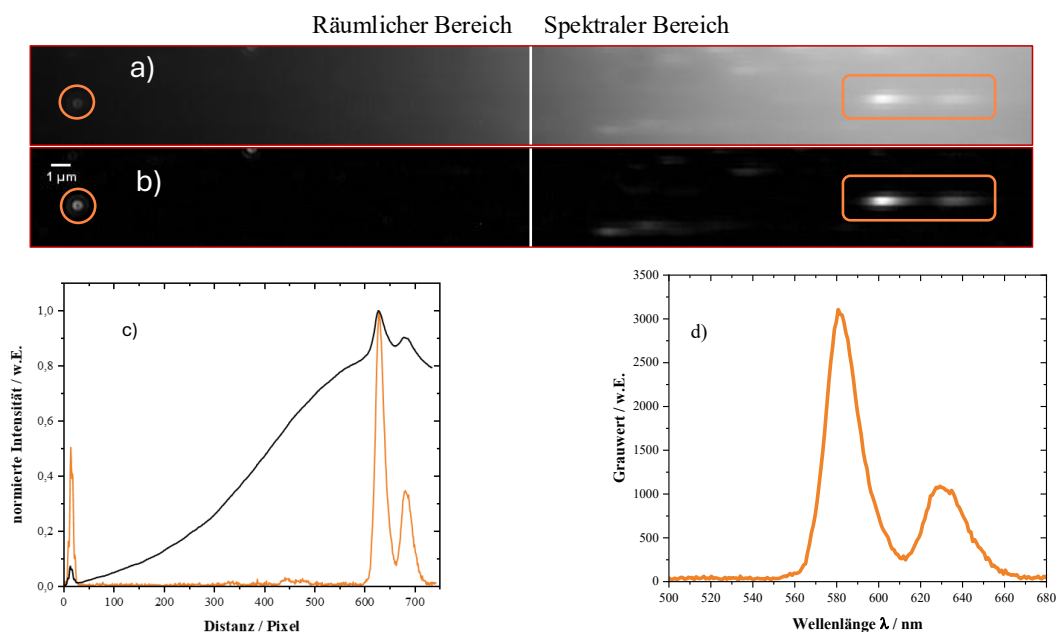


Abbildung 92: a) Spektraler und räumlicher Detektionsbereich einer Aufnahme von Terrylen in *p*-Terphenyl im spektralen o-TIRF b) nach Subtraktion des Untergrundsignals. c) Rohspektren aus dem horizontalen Intensitätsprofil aus a) (schwarz) und b) orange. Gemitteltetes Signal für a)-c) über 210 s. d) Resultierendes Spektrum nach Kalibrierung in Wellenlängenskala.

4.3.3 Datenverarbeitung zur Silylschutzgruppenchemie von Photosäuren

Zur Extraktion von Einzelmolekülspuren wurden die Aufnahmen nach Entfernen des Hintergrunds mittels der bereits erwähnten Software für Einzelmolekül-FRET (iSMS, Open Source, Single-Molecule Biophotonics Laboratory, Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Aarhus University, Dänemark) analysiert. Dazu wurde der grüne Detektionskanal als ROI des Donors und der blaue Detektionskanal als ROI des Akzeptors definiert und ausgerichtet. Somit konnte die Software dazu genutzt werden, chemische Umsetzungen auf dem Einzelmolekülniveau als Energietransfer von Molekülen aus dem grünen Kanal zum blauen Kanal zu erkennen.

Für jede Aufnahme wurde eine Optimierung der Schwellenwerte durchgeführt, bis die Anzahl der gefundenen Maxima mit einer realistischen Anzahl an Maxima aus der Belegung der Deckgläser übereinstimmte (100-200 Signalquellen). Korrespondierende Zeitspuren aus dem blauen und grünen Kanal, die Reaktionsverhalten zeigen, wurden über die „*FRET pair*“-Funktion gefunden und von der Software nach absteigender Helligkeit ausgegeben. Nur Spuren, die charakteristisches, stufenweises Verhalten zeigen, wurden für die Analyse verwendet und dazu als .txt-Datei extrahiert. Die Zeiten für das Verschwinden der grünen Eduktfluoreszenz und die Differenz bis zum Auftauchen der blauen Produktfluoreszenz, ab dem Zeitpunkt der Zugabe des Silylierungsmittels, wurden in Histogramme aufgetragen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Photooxidation von Terrylen konnte zunächst eine geeignete Strategie zur Präparation von Proben für die TIRF-Mikroskopie identifiziert werden. Das beobachtete Auftreten von Molekülen im „blauen“ Detektionskanal und die gleichzeitige Intensitätsänderung im „grünen“ Kanal wird als eine blauverschobene Absorption und Emission der Terrylenmoleküle gedeutet, die allgemein auf oxidierte Terrylderivate zurückgeführt werden kann. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der AG Basché und ähnlichen Untersuchungen^[37,197,200]. Insgesamt ließ sich das Reaktionsschema der Photooxidation von Terrylen durch Zuordnung charakteristischer Bleichzeiten zu einzelnen Reaktionsschritten ergänzen. Dies wurde durch die hohe Anzahl gleichzeitig beobachtbarer Moleküle im o-TIRF mit ausgezeichnetem SNR ermöglicht. Eine Erweiterung der TIRF-Mikroskopie ermöglichte Aufnahmen von Einzelmolekülspektren, die zur genaueren Identifizierung der detektierten Produkte beitragen konnte.

Eine sinnvolle Annahme zur Identifizierung der Photooxidationsprodukte, in Übereinstimmung mit den Einzelmolekülspektren und Clusteranalysen, ist das Vorliegen zweier Hauptfraktionen hypsochromer Verschiebungen im Bereich von etwa 40 nm und 70 nm. Durch den höheren Extinktionskoeffizienten der Photoprodukte bei den verwendeten Anregungsquellen erscheinen die Photoprodukte mit teils höheren Helligkeiten in den Detektionskanälen. Neben literaturbekannten Änderungen der Intensität unter Durchlaufen eines Dunkelzustands, wurde für das zweistufige Photobleichen eine unerwartet hohe Zahl an direkten Umsetzungen beobachtet. Diese deuten auf einen bisher unbekannten, zweiten Reaktionspfad zu den Photoprodukten hin. Auch Einzelmolekülspektren, die der 70-nm-Verschiebung zugeordnet werden, zeigten solche direkten Übergänge ohne Dunkelzustand. Strukturell ähnliche Moleküle sollten ein ähnliches Photooxidationsverhalten zeigen. Die bisherigen Überlegungen aus der Literatur, die die spektralen Verschiebungen im Bereich von 70 nm der Reaktion mit zwei Sauerstoffmolekülen an unterschiedlichen Phenylringen im Terrylengerüst zuschreiben^[200], erscheinen aus diesem Grund weniger wahrscheinlich. In Übereinstimmung mit theoretischen Ergebnissen aus der Photooxidation von TDI^[197] liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Produkten der Hauptfraktionen am ehesten um das Diepoxid (40 nm) und, entgegen bisheriger Veröffentlichungen^[37], das Mid-Diepoxid (70 nm) handelt.

Unterstützt durch die Beobachtung von „Doughnut“-Emissionsmustern vor und nach den Intensitätsänderungen lässt sich ableiten, dass die Photooxidation im *p*-Terphenyl Kristall unter Erhalt der Orientierung stattfindet. Die beobachtete Reversibilität von Intensitätsänderungen stellt einen weiteren interessanten Befund dar. Die genauere Verfolgung und Abgrenzung von alternativen Erklärungen in zusätzlichen Studien steht allerdings aus, da die geringe Gesamtanzahl der Beobachtungen keine eindeutigen Schlüsse zulässt. Beispielsweise könnten umfassende Studien im vorgestellten spektralen o-TIRF dazu dienen, die spektralen Verschiebungen solch reversibler Prozesse genauer zu verfolgen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Untersuchung der Schützungen von Photosäuren mittels Silylethern auf dem Einzelmolekülniveau. Insgesamt konnte die ausgesuchte Reaktion erfolgreich auf die Einzelmolekülebene im TIRF-Mikroskop abgebildet werden. Ausgehend vom Experiment im Ensemble konnten Parameter identifiziert werden, die die Stabilität der geschützten Photosäure beeinflussen und die Reaktionsbedingungen konnten optimiert werden. In der vorgestellten Reaktion wird von literaturbekannten Ansätzen abgewichen, da die zugesetzte Base nur zur Deprotonierung der Photosäure verwendet wurde. Da Photosäuren höhere Säurestärken als herkömmliche Alkohole besitzen, überwiegt augenscheinlich ein Protonentransfer auf die beteiligten Hilfsbasen und der katalytische Zyklus kann nicht ablaufen. Eine Umsetzung mit Silylierungsmitteln erfolgt dennoch, vermutlich durch eine S_N2 -artige Umsetzung am Si-Atom durch die deprotonierte Photosäure.

Die Schutzgruppen zeigten, unter Verwendung äquivalenter Menge Base, auch in Lösung ausreichende Stabilitäten. Gegen eine Verwendung als mögliche Sensoren spricht die mangelnde Selektivität, da die Schutzgruppe unter verschiedenen Bedingungen abgespalten werden kann. Für die Experimente auf dem Einzelmolekülniveau zeigte sich die Labilität der Schutzgruppen jedoch von Vorteil. Durch die leichte Abspaltung unter basischen Bedingungen konnte sowohl die Hin- als auch Rückreaktion einer chemischen Reaktion am selben Molekül demonstriert werden, bevor das Beobachtungsfenster durch Photobleichen eingeschränkt wird.

Da nur wenige qualitativ genügsame Einzelmolekülspuren aus den Messungen extrahiert werden konnten, steht eine aussagekräftige Statistik zur Analyse der Kinetik aus. Ein erster Vergleich der Kinetik aus den Einzelmolekülexperimenten mit Daten aus den Ensembledaten konnte gezogen werden. Vor dem Hintergrund der hohen Labilität der Schutzgruppe und dem Fehlen eines katalytischen Zyklus, erscheint der Nutzen einer weiteren Untersuchung des Systems jedoch fraglich. Insgesamt können die Ergebnisse aus beiden Teilen der Arbeit als erfolgreich durchgeführte Machbarkeitsstudie betrachtet werden, die die Leistungsfähigkeit der TIRF-Mikroskopie für die Einzelmolekülchemie demonstriert.

6 Literaturverzeichnis

- [1] R. A. L. Vallée, M. Cotlet, J. Hofkens, F. C. De Schryver, K. Müllen, *Macromolecules* **2003**, *36*, 7752–7758.
- [2] B. Pradhan, C. Engelhard, S. Van Mulken, X. Miao, G. W. Canters, M. Orrit, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 763–771.
- [3] W. Zhang, M. Caldarola, B. Pradhan, M. Orrit, *Angew. Chemie* **2017**, *129*, 3620–3623.
- [4] S. Weisenburger, D. Boening, B. Schomburg, K. Giller, S. Becker, C. Griesinger, V. Sandoghdar, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 141–144.
- [5] N. Akkilic, S. Geschwindner, F. Höök, *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *151*, 111944.
- [6] H. Shen, L. J. Tauzin, R. Baiyasi, W. Wang, N. Moringo, B. Shuang, C. F. Landes, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7331–7376.
- [7] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 2535–2538.
- [8] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *65*, 2716–2719.
- [9] B. Kozankiewicz, M. Orrit, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1029–1043.
- [10] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [11] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
- [12] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 18911–18916.
- [13] A. Robson, K. Burrage, M. C. Leake, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *368*, 20120029.
- [14] S. Adhikari, J. Moscatelli, E. M. Smith, C. Banerjee, E. M. Puchner, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3400.
- [15] J. Zirkelbach, M. Mirzaei, I. Deperasińska, B. Kozankiewicz, B. Gurlek, A. Shkarin, T. Utikal, S. Götzinger, V. Sandoghdar, *J. Chem. Phys.* **2022**, *156*, 104301.
- [16] A. Dréau, J.-R. Maze, M. Lesik, J.-F. Roch, V. Jacques, *Phys. Rev. B* **2012**, *85*, 134107.
- [17] R. Smit, A. Tebyani, J. Hameury, S. J. van der Molen, M. Orrit, *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 7960.
- [18] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 1–16.
- [19] W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* **1999**, *283*, 1670–1676.
- [20] Q. T. Easter, S. A. Blum, *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 2244–2255.

- [21] F. P. Schäfer, in *Dye Lasers* (Ed.: F.P. Schäfer), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1973**, pp. 1–85.
- [22] J. E. M. Sauer, J. Hofkens, in *Handb. Fluoresc. Spectrosc. Imaging*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2011**, pp. 1–30.
- [23] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, **2006**.
- [24] P. J. Walla, *Modern Biophysical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**.
- [25] W. E. Moerner, D. P. Fromm, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 3597–3619.
- [26] R. J. Silbey, R. A. Alberty, *Physical Chemistry*, Wiley, New York, **2001**.
- [27] M. P. Backlund, M. D. Lew, A. S. Backer, S. J. Sahl, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 587–599.
- [28] H. Mustroph, S. Ernst, B. Senns, A. D. Towns, *Color. Technol.* **2015**, *131*, 9–26.
- [29] R. Y. Tsien, L. Ernst, A. Waggoner, in *Handb. Biol. Confocal Microsc.* (Ed.: J.B. Pawley), Springer US, Boston, **2006**, pp. 338–352.
- [30] S. Inoué, in *Handb. Biol. Confocal Microsc.* (Ed.: J.B. Pawley), Springer US, Boston, **2006**, pp. 1–19.
- [31] J. C. Thiele, D. A. Helmerich, N. Oleksiievets, R. Tsukanov, E. Butkevich, M. Sauer, O. Nevskiy, J. Enderlein, *ACS Nano* **2020**, *14*, 14190–14200.
- [32] A. D. Elliott, *Curr. Protoc. Cytom.* **2020**, *92*, e68.
- [33] S. Adhikari, M. Orrit, *J. Chem. Phys.* **2022**, *156*, 160903.
- [34] A. Rybina, C. Lang, M. Wirtz, K. Großmayer, A. Kurz, F. Maier, A. Schmitt, O. Trapp, G. Jung, D. Hertel, *Angew. Chemie* **2013**, *125*, 6445–6449.
- [35] J. A. Menges, A. Grandjean, A. Clasen, G. Jung, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2630–2637.
- [36] H. Shen, X. Zhou, N. Zou, P. Chen, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 26902–26911.
- [37] T. Christ, F. Kulzer, P. Bordat, T. Basché, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40*, 4192–4195.
- [38] Q. T. Easter, S. A. Blum, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*, 12027–12032.
- [39] T. Engel, P. Reid, *Physical Chemistry Pearson New International Edition*, Pearson Education, London, **2013**.
- [40] A. Yariv, *Quantum Electronics, 3rd Edition*, John Wiley & Sons, Ltd, New York, **1989**.

- [41] T. Basché, W. P. Ambrose, W. E. Moerner, *J. Opt. Soc. Am. B* **1992**, 9, 829–836.
- [42] T. Plakhotnik, W. E. Moerner, V. Palm, U. P. Wild, *Opt. Commun.* **1995**, 114, 83–88.
- [43] P. Hinterdorfer, M. F. Garcia-Parajo, Y. F. Dufrène, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 327–336.
- [44] M. Böhmer, J. Enderlein, *J. Opt. Soc. Am. B* **2003**, 20, 554–559.
- [45] A. Yildiz, R. D. Vale, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2015**, 2015, 801–810.
- [46] S. Saurabh, S. Maji, M. P. Bruchez, *Opt. Express* **2012**, 20, 7338–7349.
- [47] R. Roy, S. Hohng, T. Ha, *Nat. Methods* 2008 56 **2008**, 5, 507–516.
- [48] P. Tchenio, A. B. Myers, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 2491–2493.
- [49] M. N. Bongiovanni, J. Godet, M. H. Horrocks, L. Tosatto, A. R. Carr, D. C. Wirthensohn, R. T. Ranasinghe, J. E. Lee, A. Ponjavic, J. V. Fritz, C. M. Dobson, D. Klenerman, S. F. Lee, *Nat. Commun.* **2016**, 7, 1–9.
- [50] E. Abbe, *Arch. für Mikroskopische Anat.* **1873**, 9, 413–468.
- [51] G. B. Airy, *On the Diffraction of an Object-Glass with Circular Aperture: From the Transactions of the Cambridge Philosophical Society, Vol. V, Part III*, Printed At The Pitt Press By John Smith, **1835**.
- [52] J. C. Waters, *J. Cell Biol.* **2009**, 185, 1135–1148.
- [53] Lord Rayleigh, *J. R. Microsc. Soc.* **1903**, 23, 474–482.
- [54] M. J. Booth, *Zenodo* **2020**, DOI <https://doi.org/10.5281/zenodo.4302488>.
- [55] F. Huang, T. M. P. Hartwich, F. E. Rivera-Molina, Y. Lin, W. C. Duim, J. J. Long, P. D. Uchil, J. R. Myers, M. A. Baird, W. Mothes, M. W. Davidson, D. Toomre, J. Bewersdorf, *Nat. Methods* **2013**, 10, 653–658.
- [56] M. F. Juetten, D. S. Terry, M. R. Wasserman, R. B. Altman, Z. Zhou, H. Zhao, S. C. Blanchard, *Nat. Methods* **2016**, 13, 341–344.
- [57] M. Levitus, *J. Chem. Educ.* **2011**, 88, 162–166.
- [58] J. Schuster, J. Brabandt, C. von Borczyskowski, *J. Lumin.* **2007**, 127, 224–229.
- [59] E. M. S. Stennett, M. A. Ciuba, M. Levitus, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1057–1075.
- [60] T. Ha, P. Tinnefeld, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, 63, 595–617.

- [61] T. Cordes, J. Vogelsang, M. Anaya, C. Spagnuolo, A. Gietl, W. Summerer, A. Herrmann, K. Müllen, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2404–2409.
- [62] M. Haase, C. G. Hübner, F. Nolde, K. Müllen, T. Basché, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1776–1785.
- [63] S. Schmid, T. Hugel, *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 1–20.
- [64] S. Sehayek, Y. Gidi, V. Glembockyte, H. B. Brandaõ, P. François, G. Cosa, P. W. Wiseman, *ACS Nano* **2019**, *13*, 11955–11966.
- [65] W. Hwang, I. B. Lee, S. C. Hong, C. Hyeon, *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12*, 1–29.
- [66] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [67] W. E. Moerner, E. J. G. Peterman, S. Brasselet, S. Kummer, R. M. Dickson, *Cytometry* **1999**, *36*, 232–238.
- [68] J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 943–945.
- [69] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
- [70] L. Colson, Y. Kwon, S. Nam, A. Bhandari, N. M. Maya, Y. Lu, Y. Cho, *Sensors* **2023**, *23*, 7691.
- [71] S. R. Sternberg, *Computer (Long. Beach. Calif.)* **1983**, *16*, 22–34.
- [72] S. Preus, S. L. Noer, L. L. Hildebrandt, D. Gudnason, V. Birkedal, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 593–594.
- [73] M. Pospeschill, *SPSS: Durchführung Fortgeschrittener Statistischer Analysen*, RRZN, Regionales Rechenzentrum Für Niedersachsen, Universität Hannover Und Fachrichtung Psychologie Der Universität Des Saarlandes, Hannover, **2012**.
- [74] OriginLab, “Cluster Analysis,” zu finden unter <https://www.originlab.com/doc/de/Origin-Help/Cluster-Analysis> . Abrufdatum 04/18/2025.
- [75] OriginLab, “Algorithmus (K-Means-Clusteranalyse),” zu finden unter <https://www.originlab.com/doc/de/Origin-Help/KCA-Algorithm> . Abrufdatum 08/05/2025.
- [76] T. A. P. M. Huijben, H. Heydarian, A. Auer, F. Schueder, R. Jungmann, S. Stallinga, B. Rieger, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3791.
- [77] P. Rubin-Delanchy, G. L. Burn, J. Griffié, D. J. Williamson, N. A. Heard, A. P. Cope, D. M. Owen, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 1072–1076.

- [78] D. M. Owen, C. Rentero, J. Rossy, A. Magenau, D. Williamson, M. Rodriguez, K. Gaus, *J. Biophotonics* **2010**, 3, 446–454.
- [79] P. Joshi, P. P. Mondal, *Photonics* **2021**, 9, 7.
- [80] R. Mhanna, J. Berger, M. Jourdain, S. Muth, R. J. Kutta, G. Jung, *ChemPhysChem* **2025**, 26, e202400996.
- [81] T. Hirschfeld, *Can. Spectrosc.* **1965**, 10, 128.
- [82] D. Axelrod, *J. Cell Biol.* **1981**, 89, 141–145.
- [83] D. Axelrod, T. P. Burghardt, N. L. Thompson, *Annu. Rev. Biophys.* **1984**, 13, 247–268.
- [84] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature* **1995**, 374, 555–559.
- [85] R. M. Dickson, D. J. Norris, Y. L. Tzeng, W. E. Moerner, *Science* **1996**, 274, 966–969.
- [86] H. Winkelmann, C. P. Richter, J. Eising, J. Piehler, R. Kurre, *Nat. Commun.* **2024**, 15, 1–19.
- [87] A. L. Mattheyses, D. Axelrod, *J. Biomed. Opt.* **2006**, 11, 014006-1-014006–7.
- [88] W. Lukosz, R. E. Kunz, *J. Opt. Soc. Am.* **1977**, 67, 1615–1619.
- [89] A. R. Khan, S. Akhlaq, M. N. B. Abid, R. Mukhtar, T. Butt, U. Qazi, *J. Nat. Sci. Math.* **2011**, 51, 31–45.
- [90] P. B. Conibear, C. R. Bagshaw, *J. Microsc.* **2000**, 200, 218–229.
- [91] M. Brunstein, M. Teremetz, K. Hérault, C. Tourain, M. Oheim, *Biophys. J.* **2014**, 106, 1020–1032.
- [92] M. Brunstein, K. Hérault, M. Oheim, *Biophys. J.* **2014**, 106, 1044–1056.
- [93] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. P. Nolan, *Cytometry* **1999**, 36, 224–231.
- [94] M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane, T. Yanagida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 235, 47–53.
- [95] C. J. Chang, *Chem. Rev.* **2024**, 124, 11639–11640.
- [96] G. P. C. Drummen, *Molecules* **2012**, 17, 14067–14090.
- [97] L. Wu, A. C. Sedgwick, X. Sun, S. D. Bull, X. P. He, T. D. James, *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 2582–2597.
- [98] A. Brodovitch, L. Limozin, P. Bongrand, A. Pierres, *Cell. Mol. Bioeng.* **2015**, 8, 178–186.
- [99] A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima, *J. Fluoresc.* **2006**, 16, 119–139.

- [100] K. A. Sapozhnikova, E. L. Gulyak, V. A. Misyurin, M. A. Simonova, E. V Ryabukhina, A. V Alexeeva, N. A. Tikhonova, N. A. Lyzhko, G. P. Popova, A. V Misyurin, A. V Ustinov, V. A. Korshun, V. A. Alferova, D. Y. Ryazantsev, V. A. Brylev, *Molecules* **2023**, *28*, 1–17.
- [101] X. Wang, Q. Ding, R. R. Groleau, L. Wu, Y. Mao, F. Che, O. Kotova, E. M. Scanlan, S. E. Lewis, P. Li, B. Tang, T. D. James, T. Gunnlaugsson, *Chem. Rev.* **2024**, *124*, 7106–7164.
- [102] C. Yan, X. Mei, X. Gong, W. Xu, *Ind. Chem. Mater.* **2024**, *2*, 85–99.
- [103] T. Fukuda, N. Funaki, T. Kurabayashi, M. Suzuki, D. H. Yoon, A. Nakahara, T. Sekiguchi, S. Shoji, *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *203*, 536–542.
- [104] C.-Y. Hsu, G. R. D. Prabhu, P. L. Urban, *HardwareX* **2021**, *10*, e00244.
- [105] T. Cordes, S. A. Blum, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 993–999.
- [106] C. Gao, Q. Gao, C. Zhao, Y. Huo, Z. Zhang, J. Yang, C. Jia, X. Guo, *Natl. Sci. Rev.* **2024**, *11*, 1–31.
- [107] T. Tachikawa, S. Yamashita, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7197–7204.
- [108] F. de Schryver, S. Nonell, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 441–441.
- [109] K. Naito, T. Tachikawa, S. C. Cui, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16430–16431.
- [110] W. Xu, J. S. Kong, Y.-T. E. Yeh, P. Chen, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 992–996.
- [111] N. M. Esfandiari, Y. Wang, J. Y. Bass, T. P. Cornell, D. A. L. Otte, M. H. Cheng, J. C. Hemminger, T. M. McIntire, V. A. Mandelshtam, S. A. Blum, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15167–15169.
- [112] S. M. Canham, J. Y. Bass, O. Navarro, S. G. Lim, N. Das, S. A. Blum, *Organometallics* **2008**, *27*, 2172–2175.
- [113] G. Jung, A. Schmitt, M. Jacob, B. Hinkeldey, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 131–137.
- [114] M. Wirtz, A. Grüter, P. Rebmann, T. Dier, D. A. Volmer, V. Huch, G. Jung, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12694–12697.
- [115] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 2926–2929.
- [116] A. A. Deniz, S. Mukhopadhyay, E. A. Lemke, *J. R. Soc. Interface* **2008**, *5*, 15–45.
- [117] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 3670–3675.

- [118] I. Rasnik, S. A. McKinney, T. Ha, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 542–548.
- [119] D. Axelrod, E. H. Hellen, R. M. Fulbright, in *Top. Fluoresc. Spectrosc. Vol. 3 Biochem. Appl.* (Ed.: J.R. Lakowicz), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1992**, pp. 289–343.
- [120] K. F. Lehtreck, *Methods Mol. Biol.* **2016**, 1454, 83–96.
- [121] J. G. Yu-Yang Jiang, Karl Lehtreck, *Methods Cell Biol.* **2015**, 127, 445–456.
- [122] H. P. Lu, L. Xun, X. S. Xie, *Science* **1998**, 282, 1877–1882.
- [123] B. M. I. Flier, M. C. Baier, J. Huber, K. Müllen, S. Mecking, A. Zumbusch, D. Wöll, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 480–488.
- [124] J. E. Reiner, A. M. Crawford, R. B. Kishore, L. S. Goldner, K. Helmersen, M. K. Gilson, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, 89, 013904.
- [125] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol'chenko, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, 1657–1665.
- [126] I. Renge, C. G. Hübner, A. Renn, H. Langhals, U. P. Wild, *J. Lumin.* **2002**, 98, 91–96.
- [127] R. M. Dickson, D. J. Norris, W. E. Moerner, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 81, 5322–5325.
- [128] H. Piwoński, A. Sokołowski, J. Waluk, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, 6, 2477–2482.
- [129] S. Kummer, T. Basché, C. Bräuchle, *Chem. Phys. Lett.* **1994**, 229, 309–316.
- [130] R. J. Pfab, J. Zimmermann, C. Hettich, I. Gerhardt, A. Renn, V. Sandoghdar, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 387, 490–495.
- [131] P. Bordat, R. Brown, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 331, 439–445.
- [132] V. Palm, N. Palm, M. Pärs, J. Kikas, *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* **2006**, 6029, 60291N-1-60291N-7.
- [133] P. J. Walla, F. Jelezko, P. Tamarat, B. Lounis, M. Orrit, *Chem. Phys.* **1998**, 233, 117–125.
- [134] V. Palm, M. Pärs, J. Kikas, *J. Lumin.* **2004**, 107, 57–61.
- [135] M. Pärs, V. Palm, M. Rahn, N. Palm, J. Kikas, *J. Lumin.* **2008**, 128, 838–841.
- [136] F. Jelezko, P. Tamarat, B. Lounis, M. Orrit, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 13892–13894.
- [137] J. L. Richards, S. A. Rice, *J. Chem. Phys.* **1971**, 54, 2014–2023.
- [138] P. Bordat, R. Brown, *J. Chem. Phys.* **2002**, 116, 229–236.
- [139] L. C. Shriver-lake, *Immobil. Biomol. Anal.* **1999**, 1–14.

- [140] T. F. O'Mahony, M. A. Morris, *Microporous Mesoporous Mater.* **2021**, *317*, 110989.
- [141] M. Lessel, O. Bäumchen, M. Klos, H. Hähl, R. Fetzer, M. Paulus, R. Seemann, K. Jacobs, *Surf. Interface Anal.* **2015**, *47*, 557–564.
- [142] Y. Takashima, T. Sahara, T. Sekine, T. Kakuta, M. Nakahata, M. Otsubo, Y. Kobayashi, A. Harada, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 1646–1652.
- [143] S. C. Wu, K. L. Lin, T. P. Wang, S. C. Tzou, G. Singh, M. H. Chen, T. L. Cheng, C. Y. Chen, G. C. Liu, T. W. Lee, S. H. Hu, Y. M. Wang, *Biomaterials* **2013**, *34*, 4118–4127.
- [144] C. Y. Lim, N. A. Owens, R. D. Wampler, Y. Ying, J. H. Granger, M. D. Porter, M. Takahashi, K. Shimazu, *Langmuir* **2014**, *30*, 12868–12878.
- [145] S. Udomsom, U. Mankong, P. Paengnakorn, N. Theera-Umpon, *Coatings* **2021**, *11*, 595.
- [146] G. W. Cline, S. B. Hanna, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3087–3091.
- [147] D. A. Long, K. Unal, R. C. Pratt, M. Malkoch, J. Frommer, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 4471–4473.
- [148] F. T. Rabouw, N. M. B. Cogan, A. C. Berends, W. Van Der Stam, D. Vanmaekelbergh, A. F. Koenderink, T. D. Krauss, C. D. M. Donega, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–7.
- [149] J. J. Cras, C. A. Rowe-Taitt, D. A. Nivens, F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 683–688.
- [150] R. G. Acres, A. V. Ellis, J. Alvino, C. E. Lenahan, D. A. Khodakov, G. F. Metha, G. G. Andersson, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 6289–6297.
- [151] Y. Wang, M. Lieberman, *Langmuir* **2003**, *19*, 1159–1167.
- [152] F. Deyhimi, J. A. Coles, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 1752–1759.
- [153] M. J. Owen, D. E. Williams, *J. Adhes. Sci. Technol.* **1991**, *5*, 307–320.
- [154] M. L. Hair, W. Hertl, *J. Phys. Chem.* **1969**, *73*, 2372–2378.
- [155] J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, *Langmuir* **2019**, *35*, 2506–2516.
- [156] E. M. Kudalkar, T. N. Davis, C. L. Asbury, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*, 435–473.
- [157] A. Ahmadi, K. Till, Y. Hafting, M. Schüttelpelz, M. Bjørås, K. Glette, J. Tørresen, A. D. Rowe, B. Dalhus, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16784.
- [158] M. A. Lieb, J. M. Zavislan, L. Novotny, *J. Opt. Soc. Am. B* **2004**, *21*, 1210–1215.
- [159] W. Lukosz, *J. Opt. Soc. Am.* **1979**, *69*, 1495–1502.

- [160] J. Sepioł, J. Jasny, J. Keller, U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 273, 444–448.
- [161] R. Girwidz, “DIPOL-ST,” zu finden unter <https://www.didaktikonline.physik.uni-muenchen.de/programme/dipolstr/Dipolstr1.html> . Abrufdatum 04/20/2025.
- [162] M. P. Backlund, M. D. Lew, A. S. Backer, S. J. Sahl, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2014**, 15, 587–599.
- [163] D. Axelrod, M. W. Davidson, “Fluorescence Emission at the Reflection Interface,” zu finden unter <https://lifescience.evidentscientific.com.cn/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfintro/> . Abrufdatum 05/01/2025.
- [164] J. A. Hutchison, H. Uji-I, A. Deres, T. Vosch, S. Rocha, S. Müller, A. A. Bastian, J. Enderlein, H. Nourouzi, C. Li, A. Herrmann, K. Müllen, F. De Schryver, J. Hofkens, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, 9, 131–136.
- [165] A. Mehta, P. Kumar, M. D. Dadmun, J. Zheng, R. M. Dickson, T. Thundat, B. G. Sumpter, M. D. Barnes, *Nano Lett.* **2003**, 3, 603–607.
- [166] W. Schroeyers, R. Vallée, D. Patra, J. Hofkens, S. Habuchi, T. Vosch, M. Cotlet, K. Müllen, J. Enderlein, F. C. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14310–14311.
- [167] T. Ha, J. Glass, T. H. Enderle, D. S. Chemla, S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 80, 2093–2096.
- [168] S. A. Rosenberg, M. E. Quinlan, J. N. Forkey, Y. E. Goldman, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 583–593.
- [169] H. Sosa, E. J. G. Peterman, W. E. Moerner, L. S. B. Goldstein, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 540–544.
- [170] A. P. Rice, F. S. Tham, E. L. Chronister, *J. Chem. Crystallogr.* **2013**, 43, 14–25.
- [171] F. Kulzer, F. Koberling, T. Christ, A. Mews, T. Basché, *Chem. Phys.* **1999**, 247, 23–34.
- [172] S. Kummer, F. Kulzer, R. Kettner, T. Basché, C. Tietz, C. Glowatz, C. Kryschi, *J. Chem. Phys.* **1997**, 107, 7673–7684.
- [173] F. Kulzer, S. Kummer, R. Matzke, C. Bräuchle, T. Basché, *Nature* **1997**, 387, 688–691.
- [174] D. Axelrod, J. C. Long, M. W. Davidson, “Evanescent Field Polarization and Intensity Profiles,” zu finden unter <https://evidentscientific.com/en/microscope-resource/tutorials/tirf/evaintensity> . Abrufdatum 05/01/2025.
- [175] E. K. L. Yeow, S. M. Melnikov, T. D. M. Bell, F. C. De Schryver, J. Hofkens, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 1726–1734.

- [176] J. Widengren, R. Rigler, *Bioimaging* **1996**, 4, 149–157.
- [177] J. Krause, M. Imlau, T. Woike, D. Schaniel, *Opt. Mater. Express* **2012**, 2, 71–77.
- [178] J. Karolin, L. B. A. Johansson, L. Strandberg, T. Ny, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7801–7806.
- [179] C. G. Hübner, A. Renn, I. Renge, U. P. Wild, *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 9619–9622.
- [180] B. Kozankiewicz, I. Deperasińska, E. Karpiuk, M. Banasiewicz, A. Makarewicz, *Opt. Mater. (Amst)*. **2011**, 33, 1391–1394.
- [181] J. A. Thorley, J. Pike, J. Z. Rappoport, in *Fluoresc. Microsc.*, Elsevier, Amsterdam, **2014**, pp. 199–212.
- [182] A. J. McLean, D. J. McGarvey, T. G. Truscott, C. R. Lambert, E. J. Land, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1990**, 86, 3075–3080.
- [183] N. Presser, Y. F. Zhu, R. J. Gordon, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 4383–4388.
- [184] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *ChemPhysChem* **2008**, 9, 2019–2027.
- [185] A. Renn, J. Seelig, V. Sandoghdar, *Mol. Phys.* **2006**, 104, 409–414.
- [186] C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 791–804.
- [187] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 2979–2995.
- [188] R. Schmidt, W. Drews, H. D. Brauer, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 4909–4913.
- [189] R. Schmidt, H. D. Brauer, *J. Photochem.* **1986**, 34, 1–12.
- [190] A. J. Bloodworth, H. J. Eggelte, in *Singlet Oxyg. Vol. II React. Modes Prod. Part I* (Ed.: A.A. Frimer), CRC Press, Boca Raton, **1985**.
- [191] W. Fudickar, T. Linker, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, 57, 12971–12975.
- [192] C. Pierlot, J. M. Aubry, K. Briviba, H. Sies, P. Di Mascio, *Methods Enzymol.* **2000**, 319, 3–20.
- [193] J. M. Aubry, C. Pierlot, J. Rigaudy, R. Schmidt, *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 668–675.
- [194] M. Orrit, J. Bernard, A. Zumbusch, R. I. Personov, *Chem. Phys. Lett.* **1992**, 196, 595–600.
- [195] M. Banasiewicz, D. Wiacek, B. Kozankiewicz, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 425, 289–293.
- [196] J. Jasny, J. Sepioł, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 273, 439–443.
- [197] H. Zhao, K. Liu, D. Song, H. Su, *J. Phys. Chem. A* **2016**, 120, 5016–5022.

- [198] Z. Liao, E. N. Hooley, L. Chen, S. Stappert, K. Müllen, T. Vosch, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19180–19185.
- [199] A. R. Reddy, M. Bendikov, *Chem. Commun.* **2006**, 1179.
- [200] T. Christ, Einzelmolekülspektroskopie Zwischen 1.4 K Und Raumtemperatur - Untersuchungen Zur Elektronischen Wechselwirkung in Multichromophoren Systemen Sowie Zur Photooxidation von Terrylen, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, **2002**.
- [201] A. Yucknovsky, N. Amdursky, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2025**, *64*, e202422963.
- [202] N. Sülzner, G. Jung, P. Nuernberger, *Chem. Sci.* **2025**, *16*, 1560–1596.
- [203] N. Agmon, W. Rettig, C. Groth, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1089–1096.
- [204] J. T. Hynes, T.-H. Tran-Thi, G. Granucci, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2002**, *154*, 3–11.
- [205] S. G. Schulman, *Spectrosc. Lett.* **1973**, *6*, 197–202.
- [206] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1949**, *36*, 186–187.
- [207] T. Förster, *Zeitschrift für Elektrochemie und Angew. Phys. Chemie* **1950**, *54*, 42–46.
- [208] D. Maus, A. Grandjean, G. Jung, *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122*, 9025–9030.
- [209] B. Finkler, C. Spies, M. Vester, F. Walte, K. Omlor, I. Riemann, M. Zimmer, F. Stracke, M. Gerhards, G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548–562.
- [210] A. C. Clasen, Immobilisierbare Pyrenderivate Zur Anwendung Als PH-Sonde, Dissertation, Universität des Saarlandes, **2019**.
- [211] B. Finkler, Synthese Und Charakterisierung von „ Super “ -Photosäuren Auf Pyrenolbasis Zur Verwendung Als Vielseitige Werkzeuge in Chemie Und Biowissenschaften, Dissertation, Universität des Saarlandes, **2017**.
- [212] A. Grandjean, J. L. Pérez Lustres, S. Muth, D. Maus, G. Jung, *J. Phys. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 1683–1689.
- [213] A. Grandjean, J. L. Pérez Lustres, G. Jung, *ChemPhotoChem* **2021**, *5*, 1094–1105.
- [214] B. Finkler, I. Riemann, M. Vester, A. Grüter, F. Stracke, G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544–1557.
- [215] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, in *Prot. Groups Org. Synth.* (Eds.: T.W. Greene, P.G.M. Wuts), John Wiley & Sons, New York, **1999**, pp. 17–245.
- [216] E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190–6191.

- [217] P. Patschinski, C. Zhang, H. Zipse, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 8348–8357.
- [218] B. A. D'Sa, D. McLeod, J. G. Verkade, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5057–5061.
- [219] P. B. Kisanga, J. G. Verkade, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5431–5432.
- [220] S. Kim, H. Chang, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, 58, 3669–3670.
- [221] S. K. Chaudhary, O. Hernandez, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 99–102.
- [222] Z. Ullah, S. Subramanian, H. Lim, N. A. Dogan, J. S. Lee, T. S. Nguyen, C. T. Yavuz, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2025**, 17, 17767–17774.
- [223] A. Bohnen, K. -H Koch, W. Lüttke, K. Müllen, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1990**, 29, 525–527.
- [224] W. E. Moerner, T. Plakhotnik, T. Irngartinger, M. Croci, V. Palm, U. P. Wild, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 7382–7389.
- [225] A. Grandjean, Die Umgebungsabhängigkeit Des Protonentransfers, Dissertation, Universität des Saarlandes, **2022**.
- [226] J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, *Langmuir* **2019**, 35, 2506–2516.
- [227] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, *ChemPhysChem* **2016**, 17, 433–442.
- [228] H. Nyquist, *Trans. Am. Inst. Electr. Eng.* **1928**, 47, 617–644.
- [229] S. H. Chien, M. F. Cheng, K. C. Lau, W. K. Li, *J. Phys. Chem. A* **2005**, 109, 7509–7518.
- [230] R. Stuhr, P. Bayer, A. J. von Wangelin, *ChemSusChem* **2022**, 15, e202201323.
- [231] J. Berger, Einbau Einer Laserengine in Den Bestehenden TIRF-Aufbau Zur Verbesserung Der Beobachtung von Photobleichen, Vertiefungsarbeit Physikalische Chemie, Universität des Saarlandes, **2022**.
- [232] R. Priester, Aufbau Und Charakterisierung von Einzelmolekülexperimenten, Vertiefungsarbeit Physikalische Chemie, Universität des Saarlandes, **2021**.
- [233] E. L. Clennan, *Photochem. Photobiol.* **2023**, 99, 204–220.
- [234] J. A. Menges, Visualisierung Chemischer Prozesse Mittels Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie, Dissertation, Universität des Saarlandes, **2020**.
- [235] A. P. Bento, F. M. Bickelhaupt, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2201–2207.

- [236] M. J. O'Neil, in *Merck Index An Encycl. Chem. Drugs, Biol.*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2013**, p. 888.
- [237] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, *Nat. Methods* **2012**, 9, 676–682.

7 Anhang

7.1 Ergänzende Abbildungen und Mikroskopiebilder

7.1.1 Allgemeine Ergänzungen

Verwendete Optiken und Bauteile

Tabelle 15 stellt eine Übersicht der verwendeten optischen Bauteile dieser Arbeit dar.

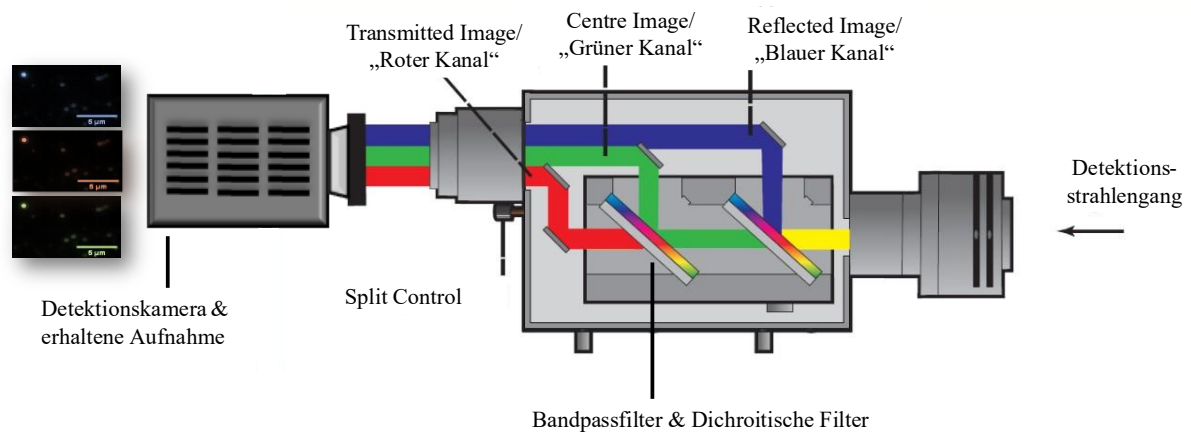
Tabelle 15: Übersicht der verwendeten optischen Bauteile.

Bezeichnung / Modell	Hersteller & Details
CW Laser	
$\lambda = 488 \text{ nm}$	Picarro, Soliton
$\lambda = 405 \text{ nm}$	Cube Diode Laser System, Coherent
$\lambda = 405 \text{ nm}$	Multifarben Laser
$\lambda = 445 \text{ nm}$	
$\lambda = 488 \text{ nm}$	
$\lambda = 515 \text{ nm}$	
$\lambda = 561 \text{ nm}$	iChrome FLE, Toptica Photonics
$\lambda = 594 \text{ nm}$	
$\lambda = 546 \text{ nm}$	Fiber Laser FL 546, Guided Color Technologies
$\lambda = 532 \text{ nm}$	CPS532-C2, Collimated Laser-Diode, Thorlabs GmbH
Objektiv	
α -Plan Fluor	α -Plan-FLUAR 100x, NA = 1.45, Zeiss
Notch, Band- & Langpassfilter	
447/60 BrightLine HC	Bandpassfilter, Semrock
HQ500/35X	Bandpassfilter, Chroma
525/50 BP	Bandpassfilter, AHF Analysentechnik
570/60 BP	Bandpassfilter, AHF Analysentechnik
550/100 ET	Bandpassfilter, Edmund Optics
590/70 BP	Bandpassfilter, AHF Analysentechnik
FELH0500	Langpassfilter >500 nm, ThorLabs
zt532	Laserstrahlteiler, AHF Analysentechnik
ZET405/488	Notch Filter, Chroma
Dichroitische Spiegel	
495 DRLP	Omega
zt488/561rpc	AHF Analysentechnik
zt532RDC	AHF Analysentechnik
zt 405/488rpc	AHF Analysentechnik
Di01-R488/543/635	Semrock
FF509-FDi01-25x36	Semrock
Kameras	
Image EM X2	EM-CCD, C9100-23B, Hamamatsu
Orca Flash 4.0 LT+	sCMOS, C11440-42U30, Hamamatsu
Orca Fusion	sCMOS, C14440-20UP, Hamamatsu

Beamsplitter

Optosplitt III

Cairn Research, anpassbar mit Bandpassfiltern und dichroitischen Spiegeln zur Aufspaltung des Detektionsstrahlengangs in definierte Farbkanäle



Aufnahme der immobilisierten Fluoreszenzbeads zur Kalibrierung der Detektionskanäle

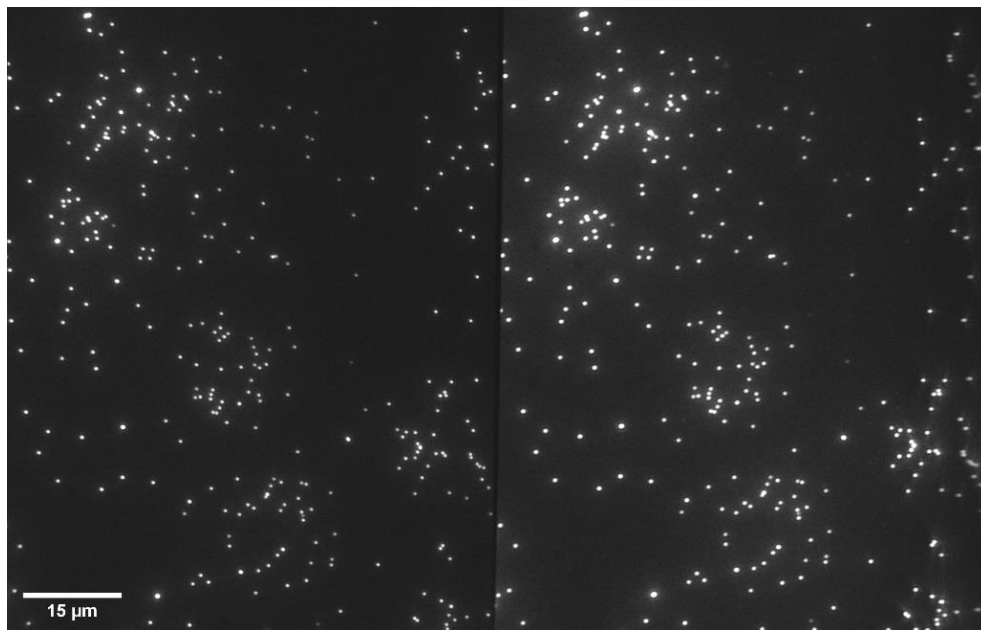


Abbildung 93: Fluoreszenzbeads im p-TIRF. $\lambda_{\text{exc}} = 405\text{nm}$ ($P = 5\text{ mW}$) / $\lambda_{\text{exc}} = 488$ ($P = 5\text{mW}$); $\lambda_{\text{det}} = 417\text{-}477\text{ nm}$ (rechts)/ $500\text{-}600\text{ nm}$ (links). 0.3s Belichtungszeit.

Auszug der Geräteparameter. Hamamatsu Orca Fusion (C14440-20UP/C14440-20UP01 Instruction manual_Ver.1.3)

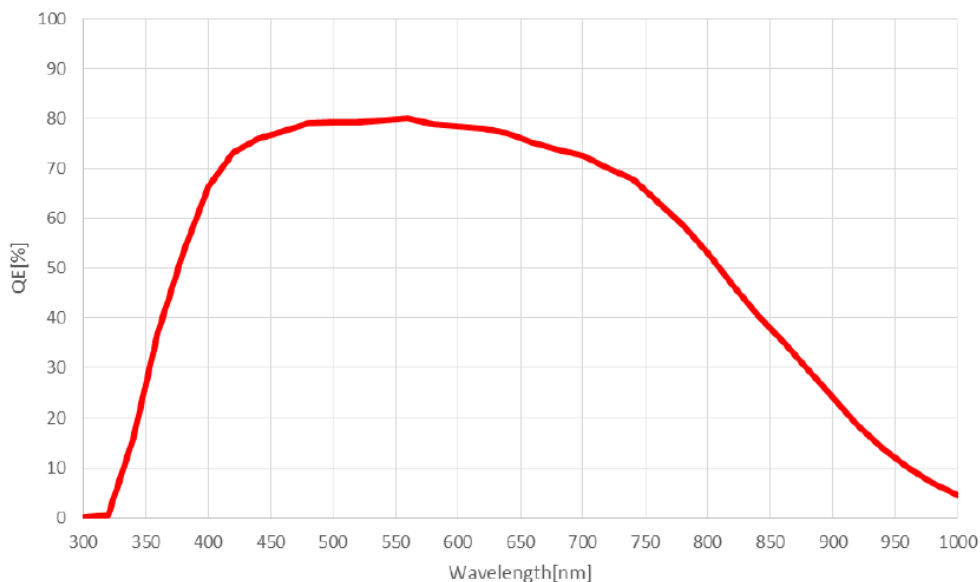
Imaging device	Scientific CMOS image sensor	Cooling method	Forced-air cooled Cooling temperature -5 °C (Ambient temperature: +25 °C)
Effective number of pixels	2304 (H) × 2304 (V)		Water cooled -5 °C (Water temperature: +25 °C)
Pixel size	6.5 μm × 6.5 μm		Water cooled (Max cooling) Less than -15 °C ^{※1 ※3}
Effective area	14.976 mm × 14.976 mm		Water cooled (Max cooling) Less than -15 °C ^{※1 ※3}
Readout noise	Fast scan 1.4 electrons	Dark current ^{※1}	cooling temperature:-5 °C 0.5 electrons/pixel/s
	Standard scan 1.0 electrons		cooling temperature:-15 °C 0.2 electrons/pixel/s
	Ultra quiet scan 0.7 electrons	Dark offset	100 counts
Quantum efficiency ^{※1}	@400 nm 65 %	Dark signal non-uniformity (DSNU) ^{※1}	0.3 electrons r.m.s.
	@550 nm 80 %	Photo response non-uniformity (PRNU) ^{※1}	(7500 electrons) 0.06 % r.m.s.
	@800 nm 50 %	Linearity error ^{※1}	(EMVA 1288 standard) 0.5 %
Full well capacity ^{※1}	15 000 electrons		
Dynamic range ^{※1}	21 400 : 1 ^{※2}		
Conversion factor ^{※1}	0.24 electrons / count		

※1 Typical value

※2 Calculated from the ratio of the full well capacity and the readout noise at ultra quiet scan

※3 The water temperature is +20 °C and the ambient temperature is +20 °C

Spectral Response Characteristics



7.1.2 Ergänzungen zur Photooxidation von Terrylen in *p*-Terphenyl

Rohdaten der Histogramme aus Kapitel 3.1.5

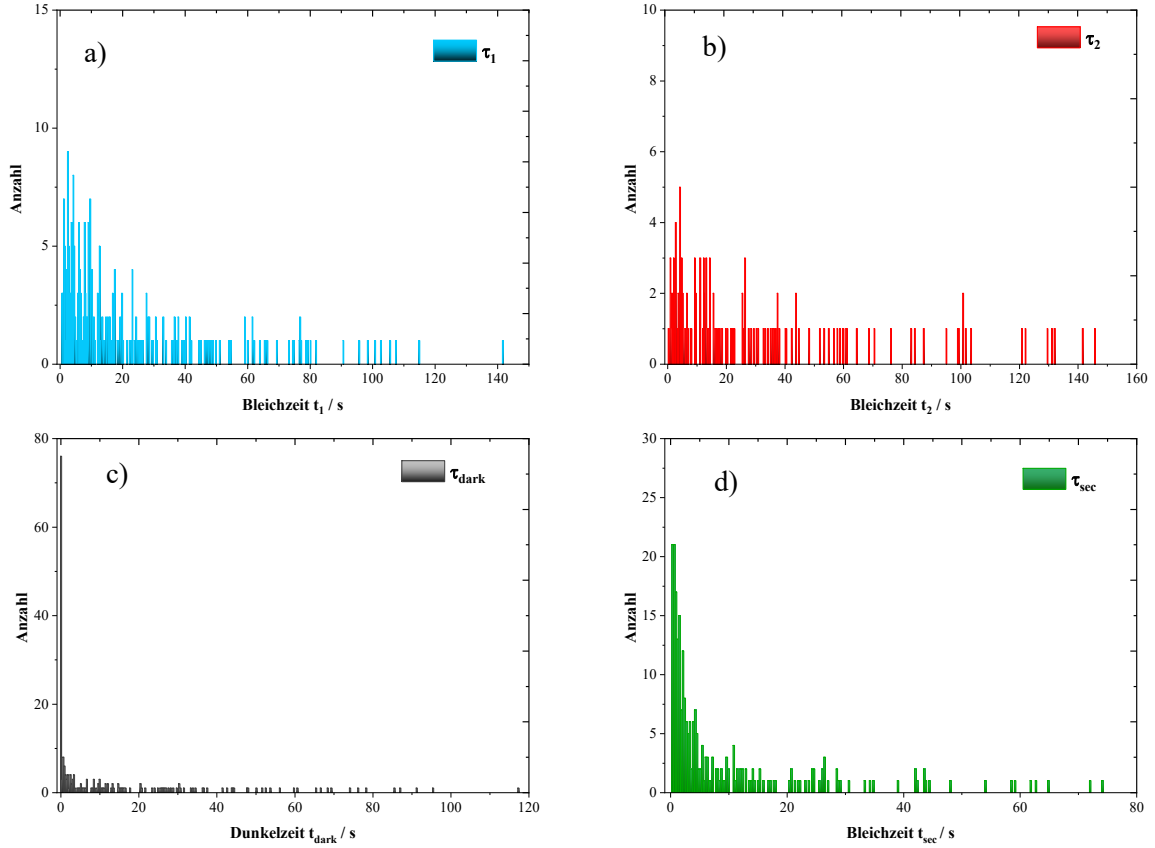


Abbildung 94: Histogramme bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546$ nm. Containerbreite 0.3 s.

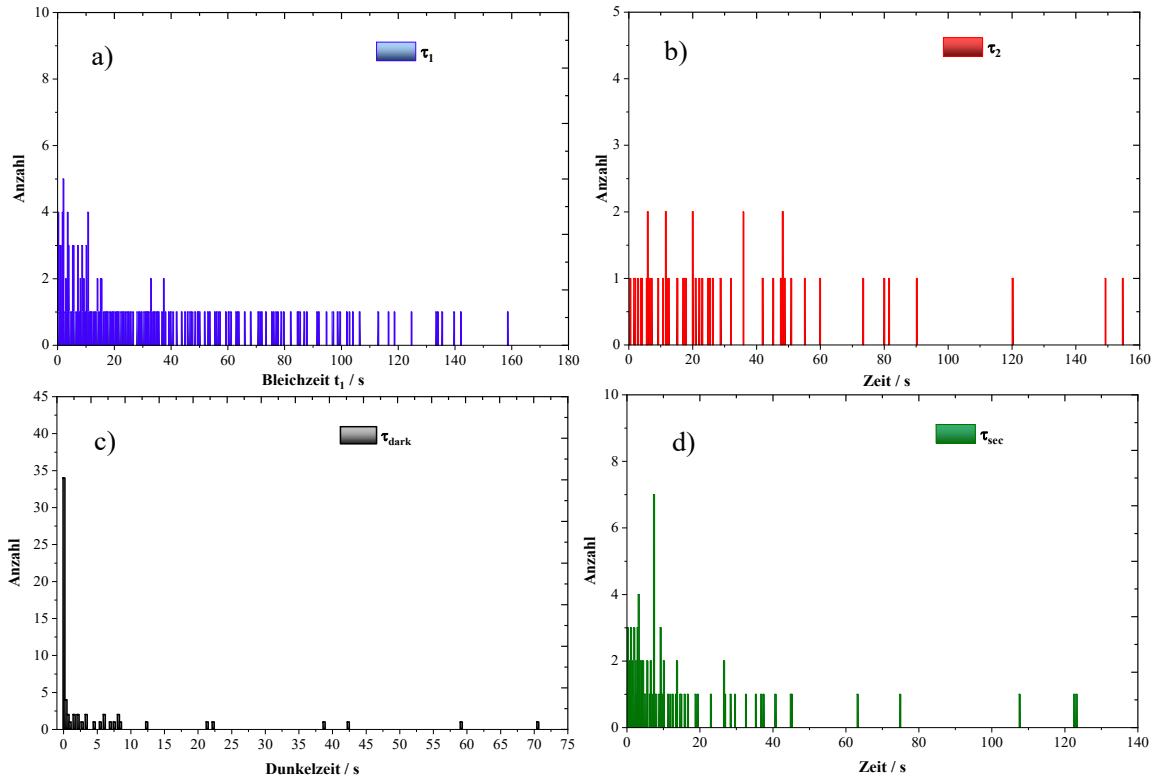


Abbildung 95: Histogramme bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm. Containerbreite 0.3s

Extinktionskoeffizient von Terrylen und den vermuteten Oxidationsprodukten

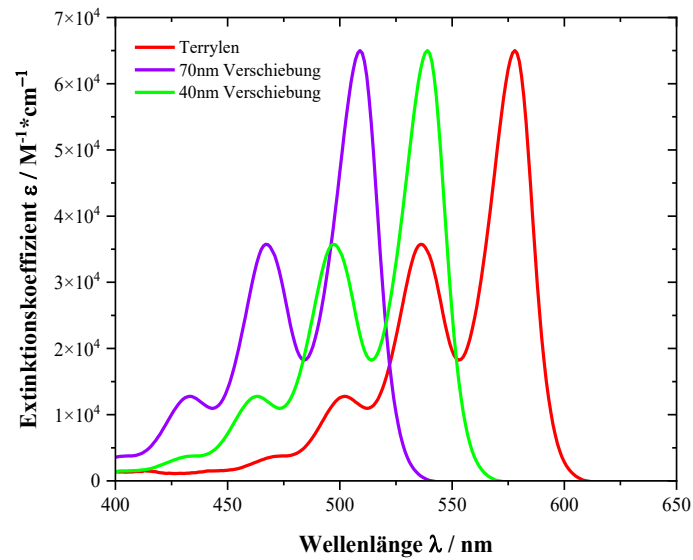


Abbildung 96: Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit der Wellenlänge für Terrylen und die vermuteten Oxidationsprodukte.

Intensitätsverhältnisse samt Ausreißer

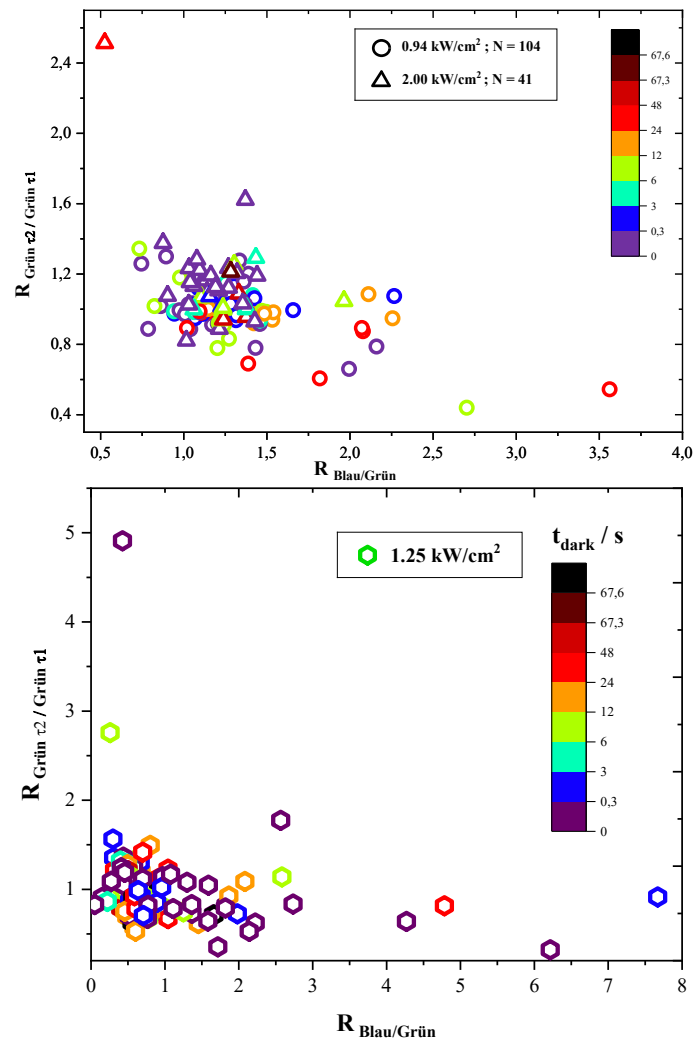


Abbildung 97: Erweiterte Darstellung von Abbildung 51 inklusive Intensitätsverhältnissen > 3.5 .

Multivariate Analyse mit alternativer Anzahl an Clusterzentren

Aus den unten gezeigten Abbildungen geht hervor, dass Anpassungen mit mehr als zwei Clusterzentren zu einer höheren Unsicherheit führen. Bei Anpassung mit drei Clusterzentren wird lediglich ein als Ausreißer deklariertes Intensitätsverhältnis als zusätzlicher Cluster identifiziert. Ab einer Anzahl von vier Clusterzentren wird die Überlappung der Konfidenzintervalle (95%) und somit die statistische Unsicherheit groß.

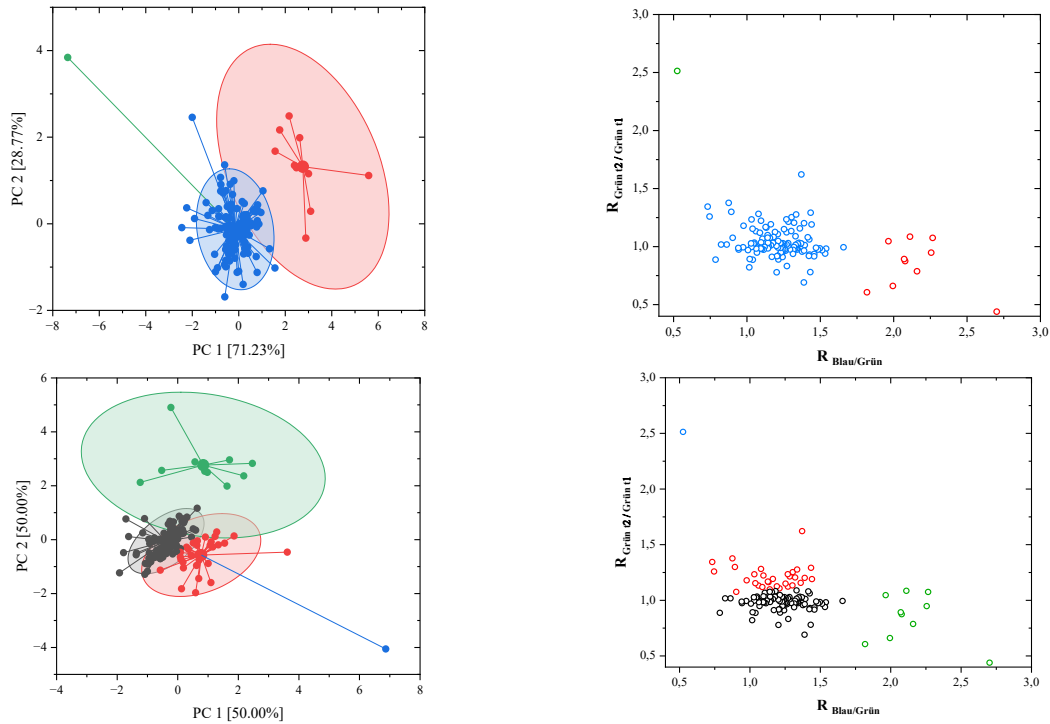


Abbildung 98: K-Means Clusteranalyse für die Anregung mit 488 nm. Oben 3, unten 4 Clusterzentren.

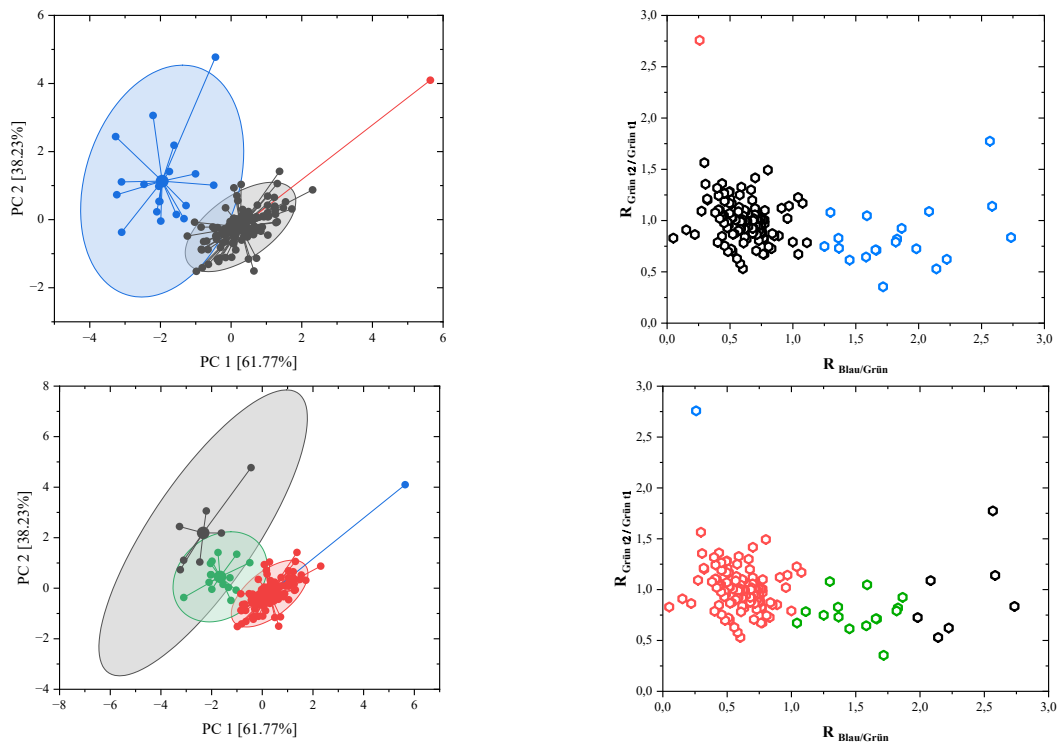


Abbildung 99: K-Means Clusteranalyse für die Anregung mit 488/546 nm. Oben 3, unten 4 Clusterzentren.

Zusätzliche Einzelmolekülpuren mit TSPB – Anregung mit 488 nm ($I = 0.94 \text{ kW/cm}^2$)

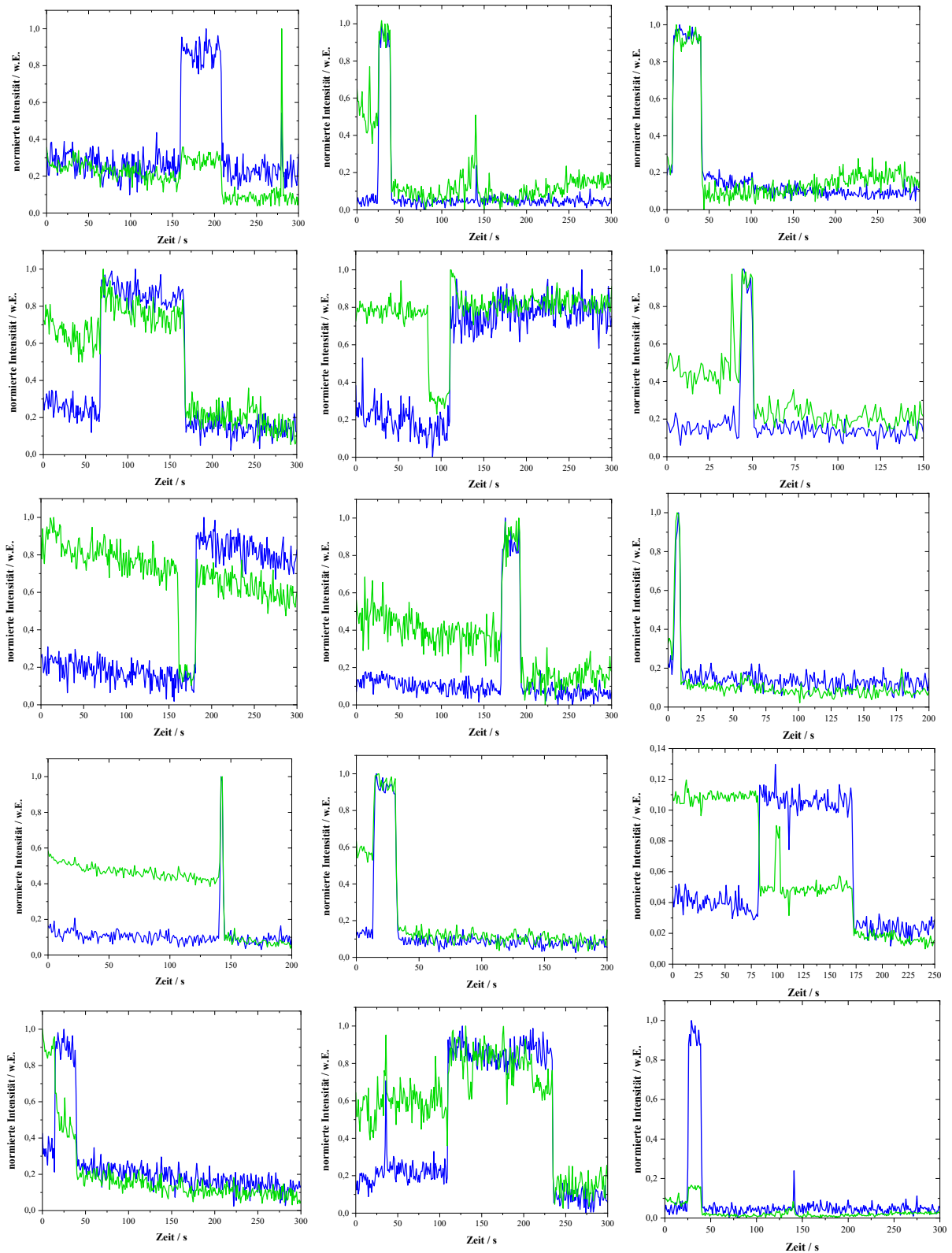


Abbildung 100: Zusätzliche Einzelmolekülpuren für die Anregung mit 488 nm ($I = 0.94 \text{ kW/cm}^2$).

Zusätzliche Einzelmolekülspektren mit TSPB – Anregung mit 488 /546nm ($I = 1.25 \text{ kW/cm}^2$)

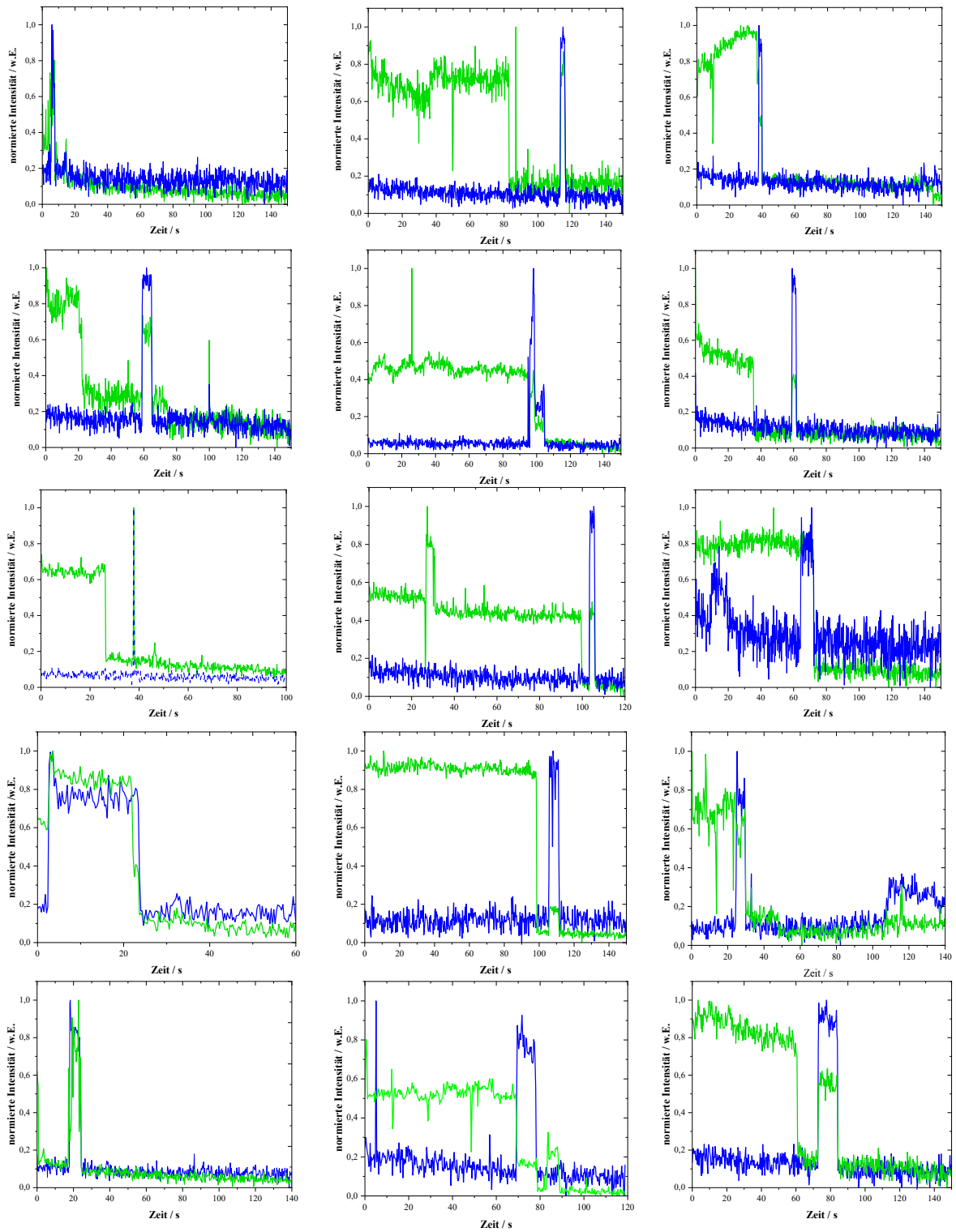


Abbildung 101: Zusätzliche Einzelmolekülspektren für die Anregung mit 488 /546 nm ($I = 1.25 \text{ kW/cm}^2$).

Beispiele für inkongruentes Verhalten

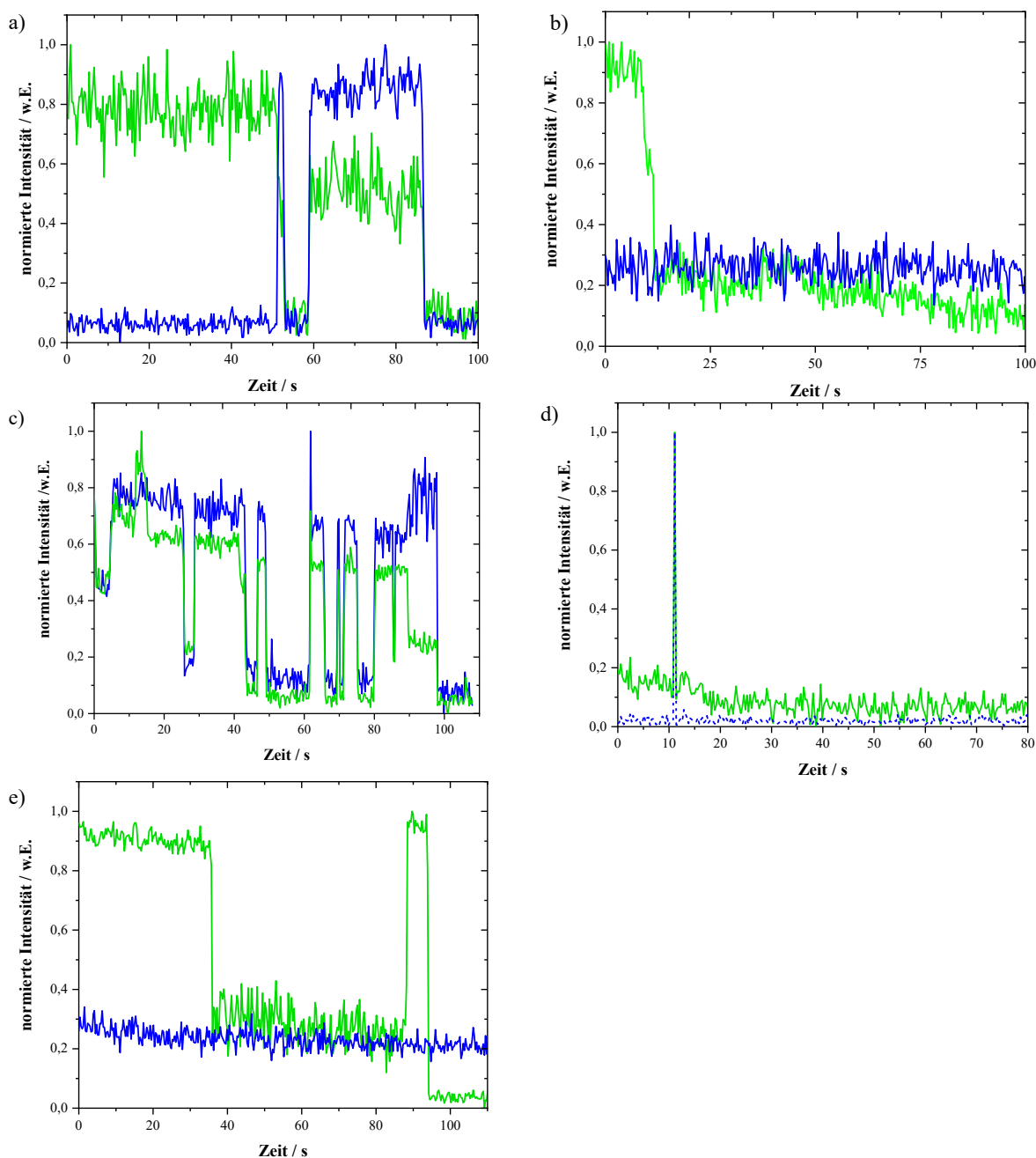


Abbildung 102: Beispiele für vereinzelt auftretendes Verhalten, das keinem der identifizierten Reaktionsschritte zugeordnet werden kann.

Die obige Abbildung zeigt Beispiele für Verhalten, das keinem der identifizierten Reaktionsschritte eindeutig zugeordnet werden konnte. a) OSPB gefolgt von einem Dunkelzustand und Änderung des Emissionsniveaus. b) Änderung des Emissionsniveaus im grünen Kanal ohne entsprechendes Signal im blauen Kanal. c) TSPB gefolgt von mehreren An/Aus-Zyklen und erneuter Änderung des Emissionsniveaus. d) Aufleuchten in beiden Kanälen ohne vorherige Detektion. e) Verringerung des Emissionsniveaus und anschließende Erhöhung ohne Aufleuchten im blauen Kanal.

Blindproben von Deckgläsern und *p*-Terphenyl im Vergleich

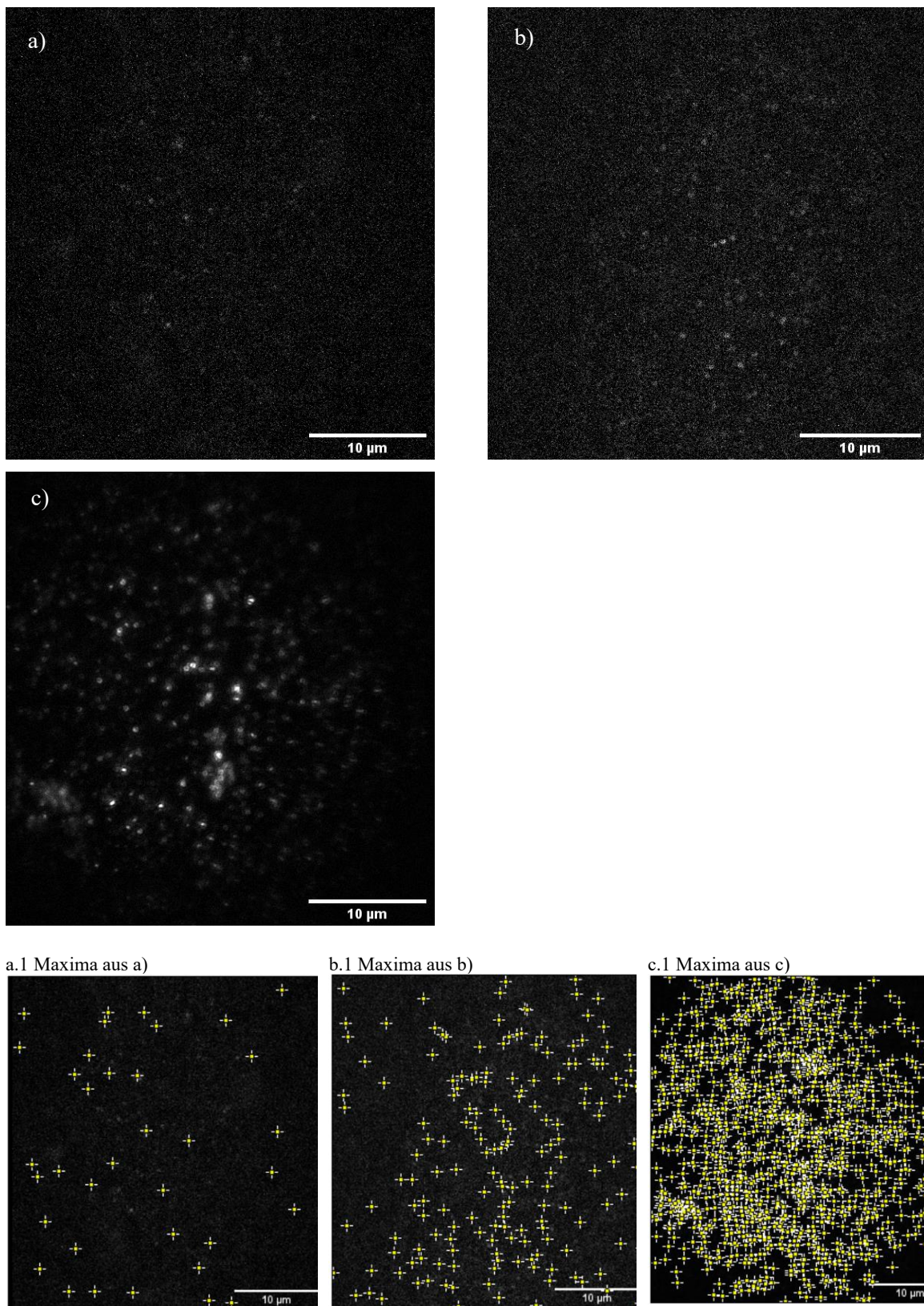


Abbildung 103: Vergleich der Aufnahme im o-TIRF für **a)** reine Deckgläser **b)** Deckgläser beschichtet mit *p*-Terphenyl und **c)** Deckgläser beschichtet mit *p*-Terphenyl/Terrylen. Anregung mit 488 nm ($P = 15$ mW). Detektion BP590/70. Einzelbilder mit Zeitauflösung 0.3 s o-type. Anzahl der gefunden Maxima in a-c unter gleichem Treshold: a.1 (36) vs b.1(170) vs c.1 (1117).

7.1.3 Ergänzungen zu Photosäuren als dual-emissive Sonden auf der Einzelmolekülebene

Ergänzende Abbildungen zur Umsetzung mit Silylierungsreagenzien

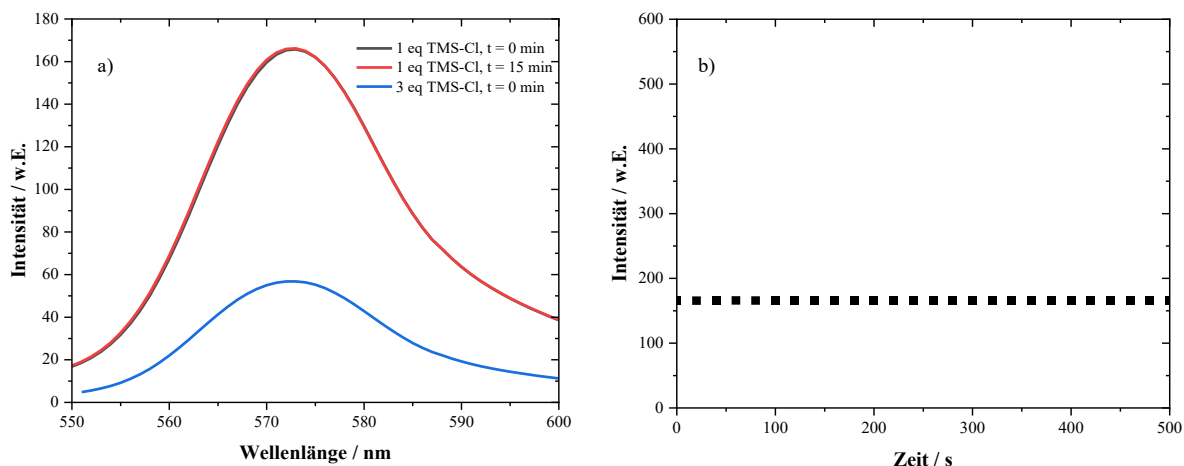


Abbildung 104: a) Emissionsspektren der Basenform von HPTE aus den Versuchen mit TMS-Cl. b) Zeitlicher Verlauf der Intensität des Emissionsmaximums aus a) beim Umsatz mit 1 eq TMS-Cl. 0-1000s.

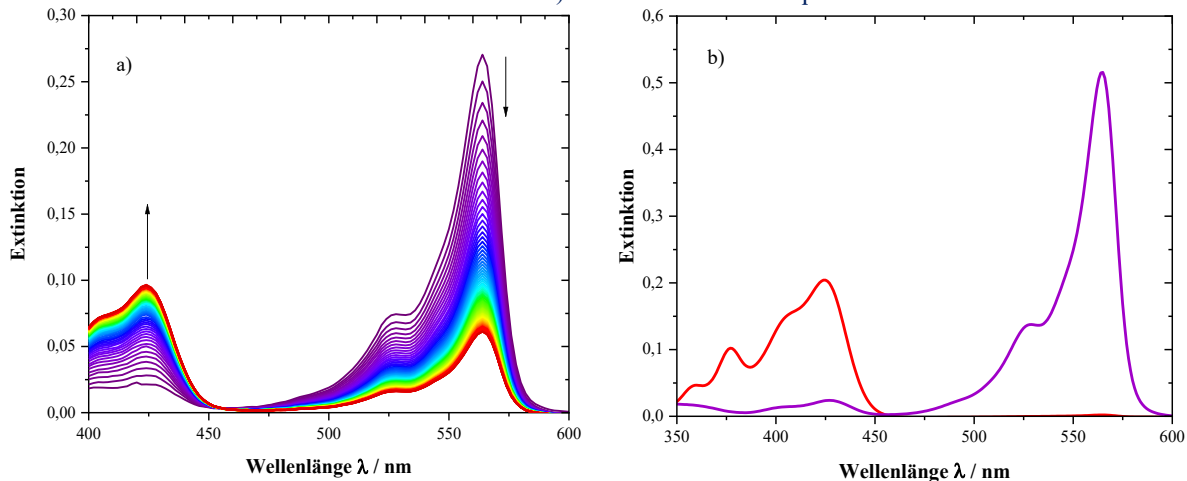


Abbildung 105: Reaktionsverfolgung im Absorptionsspektrum von HPTE. a) Absorptionsspektren mit 15 s Abstand bei $[HPTE] = [TBDPS-Cl] = 5 \mu M$. b) Umsatz nach 20 min bei $[HPTE] = [TBDPS-Cl] = 10 \mu M$.

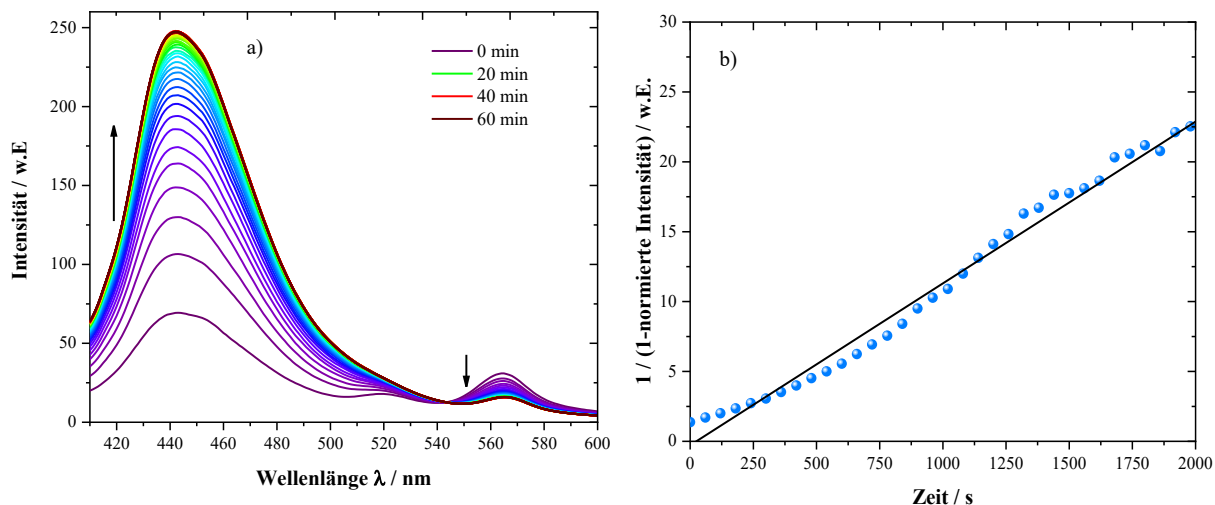


Abbildung 106: Reaktionsverfolgung im Fluoreszenzemissionsspektrum von HPDE. a) Umsetzung mit 100 eq Imidazol und 1 eq TBDMS-Cl im Abstand 60 s. b) Lineare Anpassung der reziproken, normierten Fluoreszenzintensität der Bildung der geschützten Spezies. $k_s = 1.16 \cdot 10^3 M^{-1} s^{-1}$.

Blindproben von Quarzgläsern, Lösungsmittel und Octylsilan im Vergleich

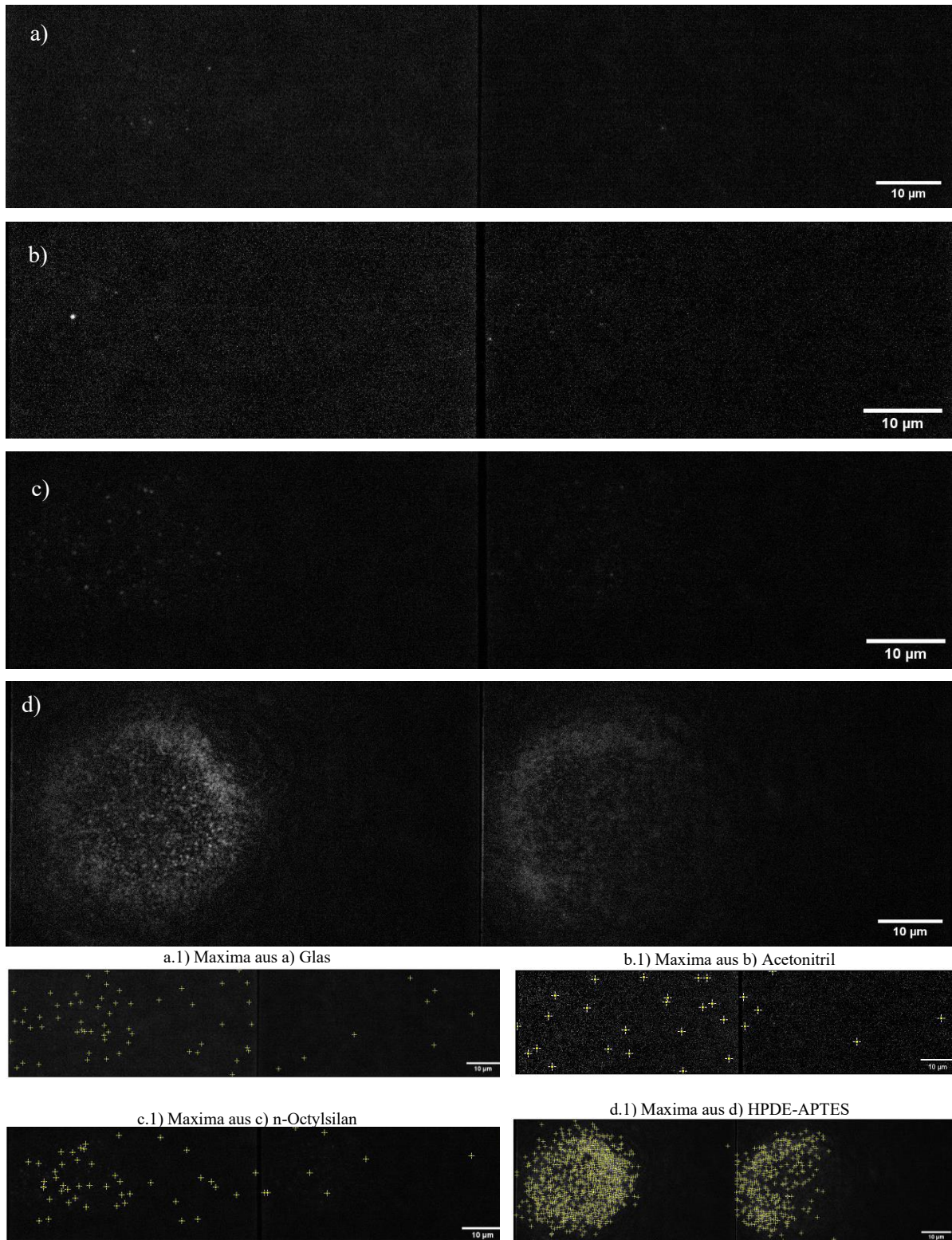


Abbildung 107: Vergleich der Aufnahme im o-TIRF für **a)** reine Quarzdeckgläser gegen Luft **b)** Quarzdeckgläser in Acetonitril **c)** Quarzdeckgläser mit n-Octyltriethoxysilan immobilisiert **d)** Quarzdeckgläser mit n-Octyltriethoxysilan/HPDE-APTES immobilisiert. Anregung und Detektion analog Kapitel 3.2.3 mit 405/488 nm. Einzelbilder mit Zeitauflösung 0.3 s. Anzahl der gefunden Maxima in a-d: a.1(66) vs b.1(28) vs c.1(54) vs d.1(1086).

7.2 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Reinheit	Herkunft
(3-Aminopropyl) triethoxysilan APTES	99%, destilliert	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Aceton	99+%, for spectroscopy	ACROS Organics
Acetonitril	≥ 99,9%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Chloroform	>99,8% f.d. HPLC	Fisher Scientific
Dichlormethan, DCM	≥ 99,9%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Dimethylformamid, DMF	>99,8% ü. Molsieb	Fisher Scientific
Essigsäure	99,8%	Acros Organics
Ethanol	absolut, >99,8%	Fisher Scientific
HPDE-Cl	/	Synthese A.Clasen
HPTE	/	Synthese B. Finkler
Imidazol	99%	Carbolution Chemicals
Methanol	ultrapure, Spectrophotometric Grade, 99.8+%	Fisher Scientific
Natriumhydrid, NaH	dry, 90%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Natriumhydroxid, NaOH	>98% reinst	Grüssing GmbH Analytica
Natriumthiosulfat Pentahydrat	zur Synthese	Grüssing GmbH Analytica
n-Octyltriethoxysilan	97%, destilliert	Merck Sigma-Aldrich Chemie
p-Terphenyl	≥99.5%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄	> 95% reinst	Bernd Kraft GmbH
TBAF	in Lösung, 1.0 M	Merck Sigma-Aldrich Chemie
TBDMS-Cl	≥99.0%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
TBDPS-Cl	98%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Terrylen	>99%	Kentax
Trifluoressigsäure, TFA	> 99 %, anhydrous	Merck Sigma-Aldrich Chemie
TMS-Cl	98%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Toluol	für HPLC, 99.9%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Triethylamin, NEt ₃	≥99.5%	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Verkade Superbase 2,8,9-Trimethyl-2,5,8,9-tetraaza- 1-phosphabicyclo[3.3.3]undecane	n.a.	Merck Sigma-Aldrich Chemie
Wasser, H ₂ O	hochrein, Gütegrad für die Spektralphotometrie	Alfa Aesar
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂	35 Gew.-%	Acros Organics

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung des HOMO und LUMO von Terrylen sowie Näherung der Übergangsdichte $\psi_2 \cdot \psi_1$. Die Richtung des Übergangsdipolmoments wird mit einem Doppelpfeil dargestellt (HOMO/LUMO generiert in ChemDraw 3D, Berechnungsmethode „Extended Hückel“).	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Absorptions- und Emissionsspektrums eines organischen Chromophors und zugrundeliegendes Energieschema im Zwei-Niveau-System.	8
Abbildung 3: Einstein-Koeffizienten im Zwei-Niveau-System.	9
Abbildung 4: Darstellung zweier Airy-Beugungsscheibchen mit radialsymmetrischer Intensitätsverteilung im Abstand D.	12
Abbildung 5: a) Immobilisierte HPDE-APTES Moleküle erscheinen als Lichtpunkte auf dem Detektionschip einer sCMOS Kamera. b) Einzelne Terrylen-Moleküle in einer <i>p</i> -Terphenyl Matrix zeigen deutliche Beugungsmuster. c) 2D- und 3D Ansicht der Beugungsmuster aus b).	13
Abbildung 6: Zusammensetzung einer typischen Einzelmolekülzeitspur mit Signal S, Untergrundzählrate U, Dunkelzählrate D und Off-Set O des Detektors. Das gezeigte Molekül wechselt kurzzeitig in einen reversiblen Dunkelzustand bevor irreversibles Photobleichen auftritt.	14
Abbildung 7: Darstellung der internen Totalreflektion zwischen zwei Medien.	16
Abbildung 8: Schematischer Aufbau mit Strahlengang von o-TIRF (links) und p-TIRF (rechts). Anregungsstrahlengang blau, Detektionsstrahlengang grün.	18
Abbildung 9: Chemische Immobilisierung eines Fluorophors auf einer Glasoberfläche mit APTES.	21
Abbildung 10: Zweistufiges Immobilisierungsschema mit Passivierung und anschließender Immobilisierung des Fluorophors.	22
Abbildung 11: a) 2D- & 3D-Ansicht der E-Feld Linien eines Hertz'schen Dipols. Erstellt mit DIPOL-ST ^[161] . b) Schematische Darstellung der Emission eines Fluorophors am Beispiel Terrylen.	23
Abbildung 12: Anisotropische Emission eines Emitters an der Grenzfläche mit paralleler und senkrechter Ausrichtung zur Oberfläche ^[163] .	23
Abbildung 13: "Doughnut"-förmige Emissionsmuster im System Terrylen/ <i>p</i> -Terphenyl.	24
Abbildung 14: Polarisierung des evaneszenten Feldes an einer Glas-Wasser Grenzfläche bei p-polarisiertem Anregungslicht. Generiert mit dem interaktiven Java Tool für TIRF von EVIDENT/Olympus ^[174] .	25
Abbildung 15: Vereinfachtes Reaktionsschema von TDI mit ¹ O ₂ . Energetische Abstände der Intermediate und Produkte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur qualitativ dargestellt. Adaptiert aus [197].	28
Abbildung 16: Reaktionsschema der Photooxidation von Terrylen nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft.	29
Abbildung 17: a) Darstellung Absorptions- und Emissionsspektrum von HPTE in Acetonitril. b) korrespondierender Förster-Zyklus.	31
Abbildung 18: Übersicht wichtiger Photosäuren und geläufige Abkürzungen. Zu Details der Synthese wird auf die Arbeiten der AG Jung verwiesen ^[210,211] .	32
Abbildung 19: Relative Stabilitäten von Silylethern gegenüber basischen und sauren Bedingungen ^[215] .	33
Abbildung 20: Allgemeines Reaktionsschema der Silylierung von Alkoholen und Mechanismus ^[221] am Beispiel von 1-Hydroxypyren.	34
Abbildung 21: Mechanismus der Silylierung mittels Verkade Base ^[218] .	34
Abbildung 22: Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektrum von Terrylen in Toluol. $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l. ...	35
Abbildung 23: Emissionsspektrum von Terrylen in Toluol im Vergleich zu <i>p</i> -Terphenyl. Das Ensemblespektrum in fester Matrix wurde von A. Grandjean aufgenommen und zur Verfügung gestellt. Siehe auch [225].	36
Abbildung 24: Übersicht der Probenvorbereitungsexperimente von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl unter verschiedenen Anregungs-/Detektionsbedingungen. Gezeigt sind gemittelte Aufnahmen der ROI über 2 min.	37
Abbildung 25: Vergleich der Spincoating Methoden unter „Lichtmikroskop“-Bedingungen. Links: Spincoating des gesamten Probenvolumens. Rechts: Optimierte Spincoating.	37
Abbildung 26: Überlagerte Aufnahmen einer Terrylen/ <i>p</i> -Terphenyl Probe mit Raumlicht und unter o-TIRF-Bedingungen. $\lambda_{exc} = 488$ nm ($P = 15$ mW); $\lambda_{det} = 540-600$ nm. Fluoreszenzaufnahme in Pseudofarben.	38
Abbildung 27: a) Einzelmolekülspur, b) TIRF-Aufnahme c) 3D-Profil von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl. Kalibrierung der Helligkeit in Grauwerten. 3D Oberflächenprofil des Moleküls eingefärbt in Pseudofarben. $\lambda_{exc} = 488/546$ nm ($P = 15/5$ mW); $\lambda_{det} = 555-625$ nm; o-TIRF.	39
Abbildung 28: a) Aufnahme von Terrylen im o-TIRF mit Nummerierung der ausgewählten Moleküle zur Bestimmung der Halbwertsbreite. b) Gaußanpassung von Molekül Nr 4 in x- und y-Richtung. $\lambda_{exc} = 488$ nm ($P = 15$ mW); $\lambda_{det} = 500-600$ nm.	40

Abbildung 29: Vergleich des Intensitätsprofils von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl, dessen Gaußanpassung und dem Profil ohne <i>p</i> -Terphenyl. Die Anpassung ergibt eine FWHM des Emissionsmusters von 377 nm.....	41
Abbildung 30: a) Aufnahme von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl mit 1 s Auflösung nach Umwandlung in Photonen pro Pixel. b) Dazugehörige Einzelmolekülzeitspur. Integration der ROI von 16x16 Pixel um das Molekül. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$); $\lambda_{\text{det}} = 555\text{-}625 \text{ nm}$; o-TIRF.....	42
Abbildung 31: Zusammenfassung der korrigierten Absorptions- und Emissionsspektren von Terrylen und den daraus generierten Produktspektren relativ zur Lage der Detektionskanäle in Pseudofarben bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm.	44
Abbildung 32: Zusammenfassung der korrigierten Absorptions- und Emissionsspektren von Terrylen und den daraus generierten Produktspektren relativ zur Lage der Detektionskanäle in Pseudofarben. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$	45
Abbildung 33: Aufnahme von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl in beiden Detektionskanälen in Pseudofarben. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$, ($P = 15/5 \text{ mW}$). Gemittelte Intensität über 50 Aufnahmen mit 0.3 s Belichtungszeit. Farbcodierung mit Pseudofarben.	46
Abbildung 34: Zusammenfassung der korrigierten elektronischen Spektren von Terrylen und dem hypothetischen Exoperoxid mit 100 nm Verschiebung.	46
Abbildung 35: Links: Aufnahme von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl in zwei Farbkanälen, gemittelt über 100 Einzelbilder. Rechts: Markierung der Intensitätsmaxima mit ImageJ. 339 Signale im grünen Kanal. 19 Signale im blauen Kanal. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ($P = 15 \text{ mW}$); $\lambda_{\text{det, grün}} = 555\text{-}625 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{det, blau}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$; o-TIRF.....	47
Abbildung 36: a)/d) Verlauf der Intensität über den gesamten Detektionsbereich einer Aufnahme von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl mit bi-exponentieller Anpassung in Rot. b)/e) Einzelaufnahme zu Beginn der Messung und c)/f) am Ende der Messung mit Anzahl der Emissionsmaxima. a-c: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $P = 15 \text{ mW}$, $\lambda_{\text{det}} = 555\text{-}625 \text{ nm}$. d-f: $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$), $\lambda_{\text{det}} = 555\text{-}625 \text{ nm}$; o-TIRF.....	48
Abbildung 37: Aufnahme von Terrylen zu charakteristischen Zeiten für TSPB. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$).	48
Abbildung 38: Beispielspuren für a) OSPB, b) TSPB mit einem deutlichen Dunkelzustand und c) TSPB ohne ersichtlichen Dunkelzustand. Δt_1 , Δt_2 , Δt_{dark} und Δt_{sec} bezeichnet jeweils die Verweildauer des Moleküls in unterschiedlichen Zuständen. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$).	49
Abbildung 39: a-d) Histogramme und monoexponentielle Anpassungen bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$. Zur besseren Erkennbarkeit wurden Container $>0.3 \text{ s}$ verwendet. Rohdaten siehe Anhang.....	51
Abbildung 40: a-d) Histogramme und monoexponentielle Anpassungen bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$. Zur besseren Erkennbarkeit wurden Container $>0.3 \text{ s}$ verwendet. Rohdaten siehe Anhang.....	51
Abbildung 41: Dunkelzustandszeiten aus Abbildung 39c. Anpassung mit $y = y_0 + A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + A_2 \cdot \exp(-x/t_2)$ in Rot.....	53
Abbildung 42: Vorgeschlagene Reaktionsschritte für Hypothese (1), direkter Weg zum Diepoxid.	53
Abbildung 43: Vorgeschlagene Reaktionsschritte für Hypothese (2).	54
Abbildung 44: a) Histogramm der Dunkelzeiten aus Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $I = 2 \text{ kW/cm}^2$. Containerbreite 1.2 s. b) Einzelmolekülspur mit 5 ms Zeitauflösung mit kurzem Dunkelzustand (Dauer 15 ms) vor einem Intensitätssprung.	54
Abbildung 45: Anteil der instantanen Umsetzungen an der Gesamtzahl der Dunkelzeiten in Abhängigkeit der verwendeten Anregungsintensitäten.	55
Abbildung 46: Gemittelte Aufnahme über 50 s im spektralen o-TIRF. Nullte Ordnung des Transmissionsgitters (links) und erste Beugungsordnung (rechts). $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ($P = 32 \text{ mW}$). $\lambda_{\text{det}} > 500 \text{ nm}$	56
Abbildung 47: a) Überlagerte Einzelmolekülspektren von Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl mit 5 s Belichtungszeit. Das Emissionsmaximum aus Ensembleexperimenten bei 581 nm wurde zum Vergleich eingezeichnet. b) Einzelmolekülspektrum von Molekül 2 aus Abbildung 46 über 210 s gemittelt und Emissionsspektrum in Toluol zum Vergleich der Linienform (gestrichelte Linie).	56
Abbildung 48: Bleichprozess mit 43 nm Verschiebung im spektralen o-TIRF. Dargestellt sind die gemittelten Aufnahmen des räumlichen und spektralen Bereichs. a) $t = 0\text{-}12.6 \text{ s}$. b) $t = 12.6 \text{ s-}46 \text{ s}$. c) Zeitspur des Moleküls über den Beobachtungszeitraum. d) Erhaltene Rohspektren und geglättete Spektren aus a)/b) in grün/blau.	57
Abbildung 49: Bleichprozess mit 69 nm Verschiebung im spektralen o-TIRF. Dargestellt sind die gemittelten Aufnahmen des räumlichen und spektralen Bereichs. a) $t = 0\text{-}9.3 \text{ s}$. b) $t = 9.3 \text{ s-}46 \text{ s}$. c) Zeitspur des Moleküls über den Beobachtungszeitraum. d) Erhaltene Rohspektren und geglätteten Spektren aus a)/b) in grün/blau.	58
Abbildung 50: Arbeitsschema zur Bildung der Intensitätsverhältnisse am Beispiel der 40 nm Verschiebung. ...	59

Abbildung 51: Intensitätsverhältnisse von Einzelmolekülpuren aus Aufnahmen mit Farbkanälen. a) Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (0.94 & 2.00 kW/cm ²). b) Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ (1.25 kW/cm ²). Die Farbcodierung der Messpunkte gibt die Überlebenszeit des Dunkelzustands wieder. Hilfslinien wurden bei $R = 1$ eingefügt. ..	60
Abbildung 52: a) Zuordnung der Umsetzungen mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ zu den erhaltenen Clustern durch K-Means Clusteranalyse. b) Zugehöriges PCA Clusterdiagramm mit Konfidenzintervall 0.95. PC1 ist die Achse, die die größte Variation überspannt; PC2 ist die Achse, die die zweite Variation überspannt.	61
Abbildung 53: a) Zuordnung der Umsetzungen mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ zu den erhaltenen Clustern durch K-Means Clusteranalyse. b) Zugehöriges PCA Clusterdiagramm mit Konfidenzintervall 0.95. PC1 ist die Achse, die die größte Variation überspannt; PC2 ist die Achse, die die zweite Variation überspannt.	62
Abbildung 54: Anstieg des Fluoreszenzsignals im System Terrylen in <i>p</i> -Terphenyl in beiden Detektionskanälen bei gleichzeitiger Anregung mit 405 nm und 488 nm. $t = 0 \text{ s}$, 34 s und 200 s. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 15/15 \text{ mW}$). $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}500 \text{ nm}$ (rechts); 555-625 nm (links).	63
Abbildung 55: Beispiel 1 für ein Molekül im System Terrylen/ <i>p</i> -Terphenyl, das reversible Änderungen der Intensität durchläuft. Links: Intensitätsverlauf. Rechts: Aufnahme der ROI um das betreffende Molekül. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.	63
Abbildung 56: Beispiel 2 für ein Molekül im System Terrylen/ <i>p</i> -Terphenyl, das reversible Änderungen der Intensität durchläuft. Links: Intensitätsverlauf. Rechts: Aufnahme der ROI um das betreffende Molekül. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$ ($P = 15/5 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.	64
Abbildung 57: Beispiel 3 für ein Molekül im System Terrylen/ <i>p</i> -Terphenyl, das reversible Änderungen der Intensität durchläuft. Links: Intensitätsverlauf. Rechts: Aufnahme der ROI um das betreffende Molekül. $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$, $P = 15/5 \text{ mW}$, Zeitauflösung 0.3 s.	64
Abbildung 58: Reaktionsschritte zur reversiblen Photooxidation von Terrylen. Adaptiert aus [193].	65
Abbildung 59: Funktionalisierung von HPDE-Cl mit APTES zum Erhalt der immobilisierbaren Spezies HPDE-APTES.	66
Abbildung 60: Elektronische Spektren der protonierten und deprotonierten Form von HPDE-APTES in Acetonitril.	67
Abbildung 61: Elektronische Spektren von HPTE in Acetonitril und Strukturformel der protonierten Form. ...	68
Abbildung 62: a) Absorptions- und b) Emissionsspektren von HPTE in Acetonitril nach Zugabe von TFA, Imidazol und TBDMS-Cl.	68
Abbildung 63: Küvetten mit einer 10 μM Lösung von HPTE in Acetonitril vor (RO^- , links) und nach (RO-TBDPS , rechts) Zugabe von Silylierungsmittel unter UV-Licht.	69
Abbildung 64: Fluoreszenzemissionsspektren von HPTE (RO^-) in Acetonitril mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen im Zeitabstand 10 s a) 100 eq Imidazol / 25 eq TBDMS-Cl. b) Literaturansatz nach Verkade [218] 0.1 eq Verkade Superbase 1.1 eq NEt_3 / 1 eq TBDMS-Cl. c) 1 eq Verkade Superbase / 1 eq TBDMS-Cl.	69
Abbildung 65: Normierte Absorptionsspektren von HPTE in Acetonitril zur Untersuchung der Langzeitstabilität nach Schützung mit 1 eq TBDMS-CL und vorheriger Deprotonierung mit 1 eq Verkade.	70
Abbildung 66: Intensitätsverlauf des Emissionsmaximums von HPTE unter verschiedenen Bedingungen. Gezeigt ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von RO^- sowie die Zunahme der Fluoreszenzintensität der geschützten Spezies a) bei Zugabe von TBDPS-Cl und b) bei Zugabe von TBDMS-Cl über die Zeit sowie c) die Auftragung der Intensität der Emissionsmaxima gegen die Zeit.	71
Abbildung 67: Auftragung der reziproken, normierten Fluoreszenzsignale. a) Aus dem Abbau von HPTE (RO^-) b) Aus der Bildung von HPTE-TBDPS. c) Aus dem Abbau von HPTE (RO^-). d) Aus der Bildung von HPTE-TBDMS. $[\text{HPTE}] = [\text{R}_3\text{-SiCl}] = 10 \mu\text{M}$	72
Abbildung 68: Absorptionsspektren aus den Versuchen mit NaH. Abgebildet ist das Absorptionsspektrum von HPTE in mit NaH behandeltem Acetonitril sowie das Absorptionsspektrum nach Zugabe von 1 eq TBDPS-Cl nach vollständigem Umsatz sowie nach zusätzlichen 24 h. $[\text{HPTE}] = [\text{TBDPS-Cl}] = 10 \mu\text{M}$	73
Abbildung 69: Auftragung der reziproken, normierten Fluoreszenzsignale für HPTE in ACN/NaH aus der Reaktion mit TBDPS-Cl. a) Bildung von RO-TBDPS . b) Verbrauch von RO^-	73
Abbildung 70: Absorptionsspektren aus den Entschützungsversuchen von HPTE mit TBDPS-Cl und TBAF in Acetonitril. $[\text{HPTE}] = 10 \mu\text{M}$	74
Abbildung 71: Reaktionsschema für die Beobachtung der Schutzgruppenchemie mit HPDE-APTES im Einzelmolekülexperiment.	75
Abbildung 72: Lichtbild des Probenträgers durch den Notchfilter 405/488 nm. a) HPDE-APTES immobilisiert in Acetonitril b) Nach Zugabe von Verkade Base c) Nach Zugabe von TBDPS-Cl.	75

Abbildung 73: Darstellung der Filterspektren in Pseudofarben relativ zur Lage der Emissionsspektren von geschützter (blau) und deprotonierter (grün) Form von HPDE-APTES.	76
Abbildung 74: o-TIRF Aufnahme von immobilisiertem HPDE-APTES. a) In ACN/NaH. b) Nach Zugabe von TBDPS-Cl. $\lambda_{\text{ex}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Belichtungszeit 0.3 s. Grüner Detektionskanal links, blauer Detektionskanal rechts.	77
Abbildung 75: Einzelmolekülzeitspuren von HPDE-APTES mit charakteristischem Abfall der Intensität nach Photobleichen. Extrahiert aus Abbildung 74 für den grünen und blauen Kanal.	77
Abbildung 76: a) Aufnahme von HPDE-APTES im o-TIRF mit Nummerierung der ausgewählten Moleküle zur Bestimmung der Halbwertsbreite im grünen Detektionskanal. b) Gaußanpassung von Molekül Nr. 3 in x- und y-Richtung. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 1/1 \text{ mW}$).	78
Abbildung 77: Normierter Intensitätsverlauf der beiden Detektionskanäle bei Zugabe von TBDPS-Cl zu immobilisiertem HPDE-APTES in ACN/NaH. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.	79
Abbildung 78: Auszug von sechs Einzelmolekülspuren aus den Experimenten mit immobilisiertem HPDE-APTES und Zugabe von Verkade Base und TBDPS-Cl in Acetonitril. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.	80
Abbildung 79: Beispiel einer Einzelmolekülspur mit zweifachem Intensitätswechsel und Aufnahme der ROI des Moleküls im o-TIRF zu charakteristischen Zeiten.	81
Abbildung 80: Auszug von Einzelmolekülspuren aus den Experimenten mit immobilisiertem HPDE-APTES und Zugabe von Verkade Base und TBDPS-Cl in Acetonitril. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.	81
Abbildung 81: Auszug von Einzelmolekülspuren aus den Experimenten mit HPDE-APTES in Acetonitril mit NaH versetzt und Zugabe von TBDPS-Cl. $\lambda_{\text{exc}} = 405/488 \text{ nm}$ ($P = 0.5/1 \text{ mW}$). Zeitauflösung 0.3 s.	82
Abbildung 82: a) Auftragung der Zeiten von 98 Einzelmolekülspuren bis zum Abfall des Fluoreszenzsignals im grünen Kanal für die Versuche mit ACN/NaH und deren Anpassung. b) Histogramme der Verzögerungszeiten zwischen Abfall des Fluoreszenzsignals im grünen und Anstieg im blauen Kanal.	83
Abbildung 83: Schematischer Aufbau und Strahlengang des TIRF-Mikroskops.	86
Abbildung 84: Übersicht der verwendeten Filter für die Untersuchung der Photooxidation von Terrylen in p-Terphenyl für die Ein-Farbenanregung a)/b) und die Zwei-Farbenanregung c)/d).	88
Abbildung 85: Sichtfeld im spektralen o-TIRF.	89
Abbildung 86: Übersicht der verwendeten Anregungslinien und Filter für die Untersuchung der Schutzgruppenchemie von HPDE-APTES.	90
Abbildung 87: Schematischer Aufbau der verwendeten Reaktionskammer. Entnommen aus [35].	91
Abbildung 88: Zeitspur eines Einzelmoleküls und daraus ermittelte Parameter zur Bestimmung des SNR.	92
Abbildung 89: Horizontales Linienprofil einer Gesamtaufnahme von Terrylen in p-Terphenyl vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) der Untergrundkorrektur.	93
Abbildung 90: Auslesen der Intensitätsverhältnisse zur Bildung der Verhältnisse aus Einzelmolekülspuren. ...	94
Abbildung 91: a) Bestimmung der Messpunkte als Distanz in Pixeln zu den Hauptmaxima der TetraSpeck-Partikel. b) erhaltene Kalibriergerade mit der Funktion $y = 0.916(\pm 0.003) \cdot \Delta x + 21(\pm 2)$	95
Abbildung 92: a) Spektraler und räumlicher Detektionsbereich einer Aufnahme von Terrylen in p-Terphenyl im spektralen o-TIRF b) nach Subtraktion des Untergrundsignals. c) Rohspektren aus dem horizontalen Intensitätsprofil aus a) (schwarz) und b) orange. Gemittelttes Signal für a)-c) über 210 s. d) Resultierendes Spektrum nach Kalibrierung in Wellenlängenskala.	95
Abbildung 93: Fluoreszenzbeads im p-TIRF. $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ($P = 5 \text{ mW}$) / $\lambda_{\text{exc}} = 488$ ($P = 5 \text{ mW}$); $\lambda_{\text{det}} = 417\text{-}477 \text{ nm}$ (rechts)/500-600 nm (links). 0.3s Belichtungszeit.	II
Abbildung 94: Histogramme bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488/546 \text{ nm}$. Containerbreite 0.3 s.	IV
Abbildung 95: Histogramme bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$. Containerbreite 0.3s.	IV
Abbildung 96: Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit der Wellenlänge für Terrylen und die vermuteten Oxidationsprodukte.	V
Abbildung 97: Erweiterte Darstellung von Abbildung 51 inklusive Intensitätsverhältnissen > 3.5	V
Abbildung 98: K-Means Clusteranalyse für die Anregung mit 488 nm. Oben 3, unten 4 Clusterzentren.	VI
Abbildung 99: K-Means Clusteranalyse für die Anregung mit 488/546 nm. Oben 3, unten 4 Clusterzentren.	VI
Abbildung 100: Zusätzliche Einzelmolekülspuren für die Anregung mit 488 nm ($I = 0.94 \text{ kW/cm}^2$).	VII
Abbildung 101: Zusätzliche Einzelmolekülspuren für die Anregung mit 488 /546 nm ($I = 1.25 \text{ kW/cm}^2$).	VIII
Abbildung 102: Beispiele für vereinzelt auftretendes Verhalten, dass keinem der identifizierten Reaktionsschritte zugeordnet werden kann.	IX

Abbildung 103: Vergleich der Aufnahme im o-TIRF für a) reine Deckgläser b) Deckgläser beschichtet mit p-Terphenyl und c) Deckgläser beschichtet mit p-Terphenyl/Terrylen. Anregung mit 488 nm ($P = 15$ mW). Detektion BP590/70. Einzelbilder mit Zeitauflösung 0.3 s o-type. Anzahl der gefunden Maxima in a-c unter gleichem Treshold: a.1 (36) vs b.1(170) vs c.1 (1117).	X
Abbildung 104: a) Emissionsspektren der Basenform von HPTE aus den Versuchen mit TMS-Cl. b) Zeitlicher Verlauf der Intensität des Emissionsmaximums aus a) beim Umsatz mit 1 eq TMS- Cl. 0-1000s.	XI
Abbildung 105: Reaktionsverfolgung im Absorptionsspektrum von HPTE. a) Absorptionsspektren mit 15 s Abstand bei $[HPTE] = [TBDPS-Cl] = 5 \mu M$. b) Umsatz nach 20 min bei $[HPTE] = [TBDPS-Cl] = 10 \mu M$	XI
Abbildung 106: Reaktionsverfolgung im Fluoreszenzemissionsspektrum von HPDE. a) Umsetzung mit 100 eq Imidazol und 1 eq TBDMS-Cl im Abstand 60 s. b) Lineare Anpassung der reziproken, normierten Fluoreszenzintensität der Bildung der geschützten Spezies. $k_s = 1.16 \cdot 10^3 M^{-1} s^{-1}$	XI
Abbildung 107: Vergleich der Aufnahme im o-TIRF für a) reine Quarzdeckgläser gegen Luft b) Quarzdeckgläser in Acetonitril c) Quarzdeckgläser mit n-Octyltriethoxysilan immobilisiert d) Quarzdeckgläser mit n-Octyltriethoxysilan/HPDE-APTES immobilisiert. Anregung und Detektion analog Kapitel 3.2.3 mit 405/488 nm. Einzelbilder mit Zeitauflösung 0.3 s. Anzahl der gefunden Maxima in a-d: a.1(66) vs b.1(28) vs c.1(54) vs d.1(1086).	XII

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erhaltene FWHM-Werte für Moleküle 1 bis 5 aus den Gaußanpassungen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW).	41
Tabelle 2: Vergleich der berechneten Anregungsrate k_{12} , Emissionsrate k_{em} und tatsächlich detektierten Photonenrate k_{real}	42
Tabelle 3: Theoretisch detektierbare Photonenrate k_{eff} und tatsächlich detektierte Photonenrate k_{real}	43
Tabelle 4: Signal-zu-Rauschen-Verhältnis für Terrylen im o-TIRF, abhängig von der Anregungswellenlänge.	43
Tabelle 5: Anteile der Emissionsspektren in Detektionskanälen als Verhältnis der durch Filter abgedeckten Fläche zur Gesamtpeakfläche von 35.1.	45
Tabelle 6: Zusammenfassung der charakteristischen Bleichzeiten aus Abb. 39 und 40.	50
Tabelle 7: Quantenausbeute der Photooxidationsschritte τ_1 und τ_2	52
Tabelle 8: Emissionsmaxima λ_{max} im spektralen o-TIRF vor (t_1) und nach (t_2) der Verschiebung ^[232]	57
Tabelle 9: Mittelwerte der detektierten Photonen, aufgetrennt nach Detektionskanälen.	58
Tabelle 10: Übersicht der ermittelten effektiven Emissionsraten und theoretischen Intensitätsverhältnisse in den Detektionskanälen für das erwartete Produktspektrum der Photooxidation von Terrylen, berechnet anhand der Spektrenflächen aus Tabelle 5.	59
Tabelle 11: Spektroskopische Parameter der untersuchten Photosäuren.	68
Tabelle 12: Erhaltene Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für eine Reaktion zweiter Ordnung aus den Auftragungen aus Abbildung 67.	72
Tabelle 13: Erhaltene FWHM-Werte für Moleküle 1 bis 5 aus Gaußanpassungen sowie daraus berechnete mittlere Auflösung und Standardabweichung.	78
Tabelle 14: Signal-zu-Rauschen-Verhältnis im o-TIRF für HPDE-APTES, getrennt nach Detektionskanal.	78
Tabelle 15: Übersicht der verwendeten optischen Bauteile.	I

7.5 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	FLE	<i>Flexible Laser Engine</i>
(EM)CCD	<i>(Electron multiplying) Charge-Coupled Device</i> (Elektronenvervielfältigendes Ladungsgekoppeltes Bauteil)	fps	<i>Frames Per Second</i> (Bilder pro Sekunde)
μ_{21}	Übergangsdipolmoment	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
μl	Mikroliter	FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> (Halbwertsbreite)
μm	Micrometer	g	Gramm
μM	Micromolar	h	Stunde
^1H NMR	<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i> (Protonenresonanz-Spektroskopie)	h	Stunde
$^1\text{O}_2$	Singulett Sauerstoff	H₂O	Wasser
2D	2-Dimensional	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
3D	3-Dimensional	H₂SO₄	Schwefelsäure
$^3\text{O}_2$	Triplett Sauerstoff	HOMO	<i>Highest Occupied Molecule Orbital</i> (Höchstes Besetztes Molekülorbital)
Å	Angstrom	HPDE-APTES	(2,2,2-trifluoroethyl)-3-hydroxy-8-(N-(3-(triethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)pyren-1,6-disulfonat
ACN	Acetonitril	HPDE-Cl	Bis(2,2,2-trifluoroethyl) 3-(chlorosulfonyl)-8-hydroxypyren-1,6-disulfonat
AcOH	Essigsäure	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Rasterkraftmikroskop)	HPTA	8-Hydroxy-N,N,N',N'',N'''-hexamethylpyren-1,3,6-trisulfonamid
AG	Arbeitsgruppe	HPTE	Tris(2,2,2-trifluoroethyl)-8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan	I₀	Anregungsintensität
ca.	circa	IC	<i>Internal Conversion</i> (Innere Konversion)
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i> (Ladungsgekoppeltes Bauteil)	ISC	<i>Intersystem Crossing</i> (Interkombinationsübergang)
Cl	Chlorid	K	Kelvin
cm²	Quadratcentimeter	kW	Kilowatt
CW	<i>Continuous Wave</i> (Dauerstrich)	l	Liter
D	Donor	LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (Niedrigstes Unbesetztes Molekülorbital)
DBN	1,5-Diazabicyclo(4.3.0)non-5-en	M	Molar
DBU	Diazabicycloundecen	min	Minute
DCM	Dichlormethan	ml	Milliliter
DFT	Dichtefunktionaltheorie	mM	Millimolar
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin	mmol	Millimol
DMF	Dimethylformamid	ms	Millisekunde
DMSO	Dimethylsulfoxid	mW	Milliwatt
E	Energie	MW	Mittelwert
EE	Einsammeleffizienz	NA	Numerische Apartur
eq	Äquivalente	NEt₃	Triethylamin
ESPT	<i>Excited State Proton Transfer</i> (Protonentransfer im angeregten Zustand)	NHS	N-Hydroxysuccinimid
ET	<i>Exposure Time</i> (Belichtungszeit)	NIR	<i>Near Infrared</i> (Nahinfrarot)
et al.	und andere	nm	Nanometer
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	ns	Nanosekunde
		NSOM	<i>Near-field Scanning Optical Microscopy</i> (Optische Nahfeldmikroskopie);

NV-Zentrum	<i>Nitrogen-Vacancy Center</i> (Stickstoff-Fehlstellen-Zentrum)	S	Singulett
O₂	Sauerstoff	s	Sekunde
OH⁻	Hydroxyl	sCMOS	<i>scientific Complementary Metal–Oxide–Semiconductor</i> (komplementärer Metall-Oxid-Halbleiter)
OSPB	<i>One Step Photobleaching</i> (einstufiges Photobleichen)	SiO₂	Siliziumdioxid
o-TIRF	objektivbasierte Interne Totalreflexionsfluoreszenz	SMS	<i>Single Molecule Spectroscopy</i> (Einzelmolekülspektroskopie)
P	Leistung	SNR	<i>Signal-To-Noise Ratio</i> (Signal-zu-Rauschen-Verhältnis)
p-	para-	SPT	<i>Single-Particle Tracking</i> (Einzelpartikelverfolgung)
PAINT	<i>Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography</i>	STABW	Standardabweichung
PALM	<i>Photoactivated Localization Microscopy</i>	STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i> (Stimulierte Emissionsunterdrückung)
PC	<i>Principal Component</i> , (Hauptkomponente)	STORM	<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i> (Stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> , (Hauptkomponentenanalyse)	T	Triplet
PDI	Perylendiimid	t	Zeit
PE	Polyethylen	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
PEG	Polyethylenglykol	TBDMS-Cl	t-Butyldimethylsilylchlorid
PET	<i>Photoinduced Electron Transfer</i> (photoinduzierter Elektronentransfer)	TBDPS-Cl	t-Butyldiphenylsilylchlorid
pKS	Säurestärke	TDI	Terrylendiimid
PMMA	Polymethylmethacrylat	TES-Cl	Triethylsilylchlorid
PPY	4-(1-Pyrrolidinyl)pyridin	TFA	Trifluoressigsäure
PS	Polystyrol	TiO₂	Titandioxid
PSF	Punktspreizfunktion	TIPS-Cl	Triisopropylsilylchlorid
p-TIRF	prismenbasierte Interne Totalreflexionsfluoreszenz	TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> (Interne Totalreflexionsfluoreszenz)
PVA	Polyvinylalkohol	TIRFM	<i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i> (Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie)
Rh6G	Rhodamin 6G	TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
RISC	<i>Reverse Intersystem Crossing</i> (Umgekehrte Interkombination)	TSPB	<i>Two Step Photobleaching</i> (zweistufiges Photobleichen)
RO-	Deprotonierte Photosäure / Basenform	UV	Ultraviolett
ROH	Protonierte Photosäure / Säureform	W	Watt
ROI	<i>Region Of Interest</i> (relevanter Messbereich/Bildausschnitt)	w.E.	Willkürliche Einheit
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)	z.B.	zum Beispiel
RT	Raumtemperatur	λ	Wellenlänge