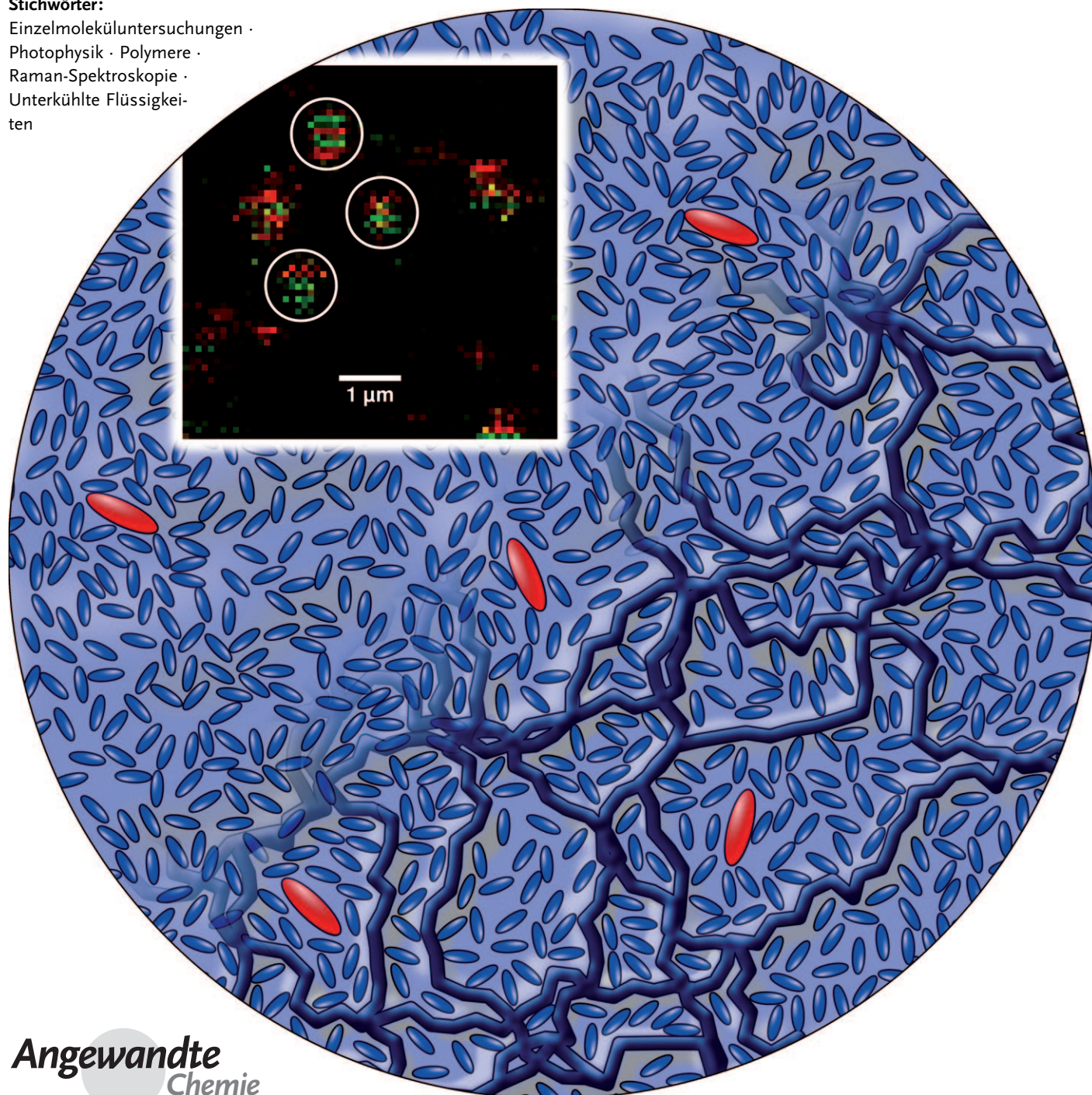


# Einzelmoleküle als optische Nanosonden für weiche und komplexe Materie

Florian Kulzer, Ted Xia und Michel Orrit\*

**Stichwörter:**

Einzelmoleküluntersuchungen ·  
Photophysik · Polymere ·  
Raman-Spektroskopie ·  
Unterkühlte Flüssigkeiten



**O**ptische Signale von Einzelmolekülen liefern Informationen über die Struktur und Dynamik ihrer nanoskaligen Umgebung, frei von zeitlichen und räumlichen Mittelungen. Die so erhaltenen Daten sind von Nutzen, wenn komplexe Strukturen oder Dynamiken auftreten, wie bei Polymeren oder porösen Oxiden, aber auch bei anderen Materialien, deren Heterogenität zunächst weniger offensichtlich ist. Der Aufsatz gibt einen Überblick über die wichtigsten aktuellen Anwendungen von Einzelmolekülen in Untersuchungen an kondensierter Materie auf Nanometerebene, mit Betonung auf weicher Materie und Materialwissenschaften. Beispiele umfassen die Orientierungsverteilung von Molekülen in Kristallen, Rotationsdiffusion in glasbildenden molekularen Flüssigkeiten, Studien an Polymeren mit Sonden und markierten Ketten, poröse und heterogene Oxidmaterialien, das Blinken einzelner Moleküle und Nanokristalle sowie das Potenzial oberflächenverstärkter Raman-Streuung für die Analyse lokaler chemischer Eigenschaften. Die Beispiele zeigen, dass statische und dynamische Heterogenität und die Breiten der Verteilungen molekularer Parameter wesentlich größer sind, als bisher angenommen.

## 1. Einführung

Die Nanowissenschaft ist der Zweig der Physik, der sich mit der Struktur, der Dynamik und den Eigenschaften kondensierter Materie auf der Nanometerebene (zwischen 1 und ca. 100 nm) befasst. Besteht aber wirklich ein Bedarf für dieses neue Konzept? Skeptiker mögen argumentieren, dass die Quantenmechanik die einzig angemessene Beschreibung von Phänomenen in der Größenordnung von Elektronen, Atomen oder Molekülen ist. Andererseits scheinen aus der Kontinuumsphysik abgeleitete Konzepte Materie auf makroskopischer Skala häufig recht präzise zu beschreiben, zumindest auf Skalen deutlich oberhalb jener der Größe von Molekülen. Es zeigt sich aber, dass die Einführung einer mesoskopischen Zwischenskala nicht nur hilfreich, sondern aus zwei eindeutigen Gründen auch notwendig ist: Erstens ist die Quantenmechanik, so unersetzlich sie als konzeptionelle Grundlage nanoskaliger Physik auch ist, bei ausgedehnten Systemen nur äußerst schwer praktisch anwendbar. Diese Schwierigkeit ergibt sich hauptsächlich aus dem exponentiellen Anwachsen der beteiligten Quantenzustände mit der Größe des Systems. Tatsächlich ist gerade diese Komplexität die Grundlage für die neuartigen, leistungsfähigen Algorithmen der Quanteninformatik. Der Reichtum an exotischen Phänomenen, wie er sich bei größeren Ensembles korrelierter Fermionen zeigt, ist eine gute Illustration für Quantenkomplexität. Viele dieser Effekte hätten nur schwerlich theoretisch vorhergesagt werden können. Wie Anderson in seiner bekannten Kolumne<sup>[1]</sup> schrieb: „more is different“, d.h., Komplexität kann zum Entstehen qualitativ neuer Eigenschaften führen. Zweitens hat die direkte Beobachtung von Materie auf Nanometerebene, wie sie erst in letzter Zeit möglich geworden ist, bereits zu vielen unerwarteten, häufig der Intuition widersprechenden Resultaten geführt, die eine Herausforderung für allein auf makroskopischen Konzepten

## Aus dem Inhalt

1. Einführung	867
2. Konzepte und Techniken der Einzelmoleküloptik	868
3. Anwendungen von Einzelmolekültechniken	870
4. Schlussfolgerungen und Ausblick	876

beruhende Interpretationsansätze darstellen. Materie scheint auf der Nanometerebene wesentlich komplexer, vielfältiger und überraschender zu sein, als noch bis vor kurzem angenommen wurde. Wie schon so häufig in der Geschichte der Wissenschaft erschließt ein neues „Beobachtungsfenster“ ganz neuartige Einblicke.

In diesem Aufsatz sollen die bekannten Vorteile von Beobachtungen auf molekularer Ebene kurz zusammengefasst werden. Bei Untersuchungen an Einzelmolekülen tritt keinerlei Ensemblemittelung auf, und die ganze Variabilität der Mikroumgebungen wird erkennbar, genauso wie das volle Ausmaß der Verteilung der molekularen oder lokalen Parameter. Die direkte Beobachtung statischer oder räumlicher Heterogenität ist besonders nützlich bei komplexen Systemen wie porösen Materialien, bei denen gerade die Unordnung eine intrinsische Struktureigenschaft ist. Einzelmolekülmessungen liefern aber nicht nur Strukturinformationen, sondern eröffnen auch einen einzigartigen Zugang zur Dynamik, da die Details individueller Fluktuationen nicht mehr in Mittelwertbildungen untergehen und somit keine Synchronisation eines Ensembles notwendig ist, um derartige Fluktuationen beobachten zu können. So wird der direkte Vergleich mit theoretischen Modellen möglich, und es sind keine anpassbaren Verteilungsfunktionen mehr enthalten. Dies ermöglicht es, wesentlich zuverlässigere und dadurch relevantere Aussagen zu machen.

In diesem Aufsatz beschäftigen wir uns ausschließlich mit optischen Einzelmolekülmethoden. Andere etablierte Me-

[\*] M. Sc. T. Xia, Prof. M. Orrit  
Molecular Nano-Optics and Spins (MoNOS), Universität Leiden  
P.O. Box 9504, 2300RA Leiden (Niederlande)  
Fax: (+31) 71-527-5819  
E-Mail: orrit@molphys.leidenuniv.nl  
Prof. F. Kulzer<sup>[†]</sup>  
ICFO – Institut de Ciències Fotoniques  
Mediterranean Technology Park, 08860 Castelldefels, Barcelona  
(Spanien)

[†] Ständige Anschrift: Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, Université Lyon 1  
10 rue Ada Byron, 69622 Villeurbanne (Frankreich)



thoden wie die Elektronenmikroskopie und insbesondere rastersondenmikroskopische Verfahren [Rastertunnelmikroskopie (STM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM)] und deren verschiedene Varianten bleiben weiterhin ein unverzichtbarer Zugang zur Nanowissenschaft. Aber so leistungsfähig diese Methoden auch sind – sie haben ihre Grenzen. Sie ermöglichen häufig nur Untersuchungen von Oberflächen oder dünnen Proben in einem engen Bereich experimenteller Bedingungen, erfordern hohe Stabilitäten und haben häufig ein nur beschränktes Blickfeld.

Optische Einzelmolekülspektroskopie beruht dagegen auf einer mit Licht arbeitenden Technik, der optischen Fernfeldmikroskopie. Da sie auf dem optischen Signal eines einzelnen Moleküls (oder eines einzelnen Lichtemitters oder -absorbers) beruht, bringt sie all die Vorteile optischer Verfahren mit sich: Sie ist im Allgemeinen nichtinvasiv, einfacher zu realisieren als Rastersondenmethoden und ergänzt diese in vielerlei Hinsicht. Sie ermöglicht die Untersuchung transparenter Medien in drei Dimensionen – also auch weit unterhalb der Oberfläche – und die parallele Aufnahme der Daten vieler Moleküle zur selben Zeit. Darüber hinaus macht ein vielseitiges Repertoire von spektroskopischen Techniken zeit- und frequenz aufgelöste Daten über die Probe zugänglich, aus denen sich räumlich aufgelöste chemische Informationen von einzelnen oder zumindest nur wenigen Molekülen ableiten lassen.<sup>[2]</sup>

Nach Erfindung der Rastersondenmikroskopie in den 1980er Jahren<sup>[3,4]</sup> kam in den frühen 1990ern die Einzelmolekülspektroskopie hinzu,<sup>[5,6]</sup> zunächst mit Experimenten bei tiefen Temperaturen. Ein wichtiger nächster Schritt war die Abbildung der Fluoreszenz immobilisierter Moleküle mit Nahfeldoptik,<sup>[7–10]</sup> der kurze Zeit später ähnliche Experimente mit konfokaler Mikroskopie folgten.<sup>[11–14]</sup> Dank steter Fortschritte bei der konfokalen Mikroskopie und den auf dem Lawineneffekt beruhenden Festkörperphotodioden konnte diese Methode in den späten 1990ern schnell auf eine große Zahl von Systemen ausgedehnt werden, insbesondere auch wegen ihres großen Potenzials für die Untersuchung biophysikalischer und biochemischer Fragen. Anwendungen in der physikalischen Chemie, die es bereits von Anfang an gab, wurden durch den spektakulären Boom im Bereich der Biophysik etwas in den Hintergrund gedrängt, sind aber kontinuierlich erweitert worden. Ziel dieses Aufsatzes ist es, das Potenzial von optischen Einzelmolekülmethoden in der

physikalischen Chemie und den Materialwissenschaften, besonders für Untersuchungen weicher und komplexer Materie, zu verdeutlichen und dabei einige der Überraschungen, die sich für uns aus den Einzelmolekülbeobachtungen ergeben haben, herauszustellen. Wir werden die derzeitigen Techniken zur Einzelmolekülmessung sowie einige, die in Zukunft von Interesse sein könnten, behandeln. Anschließend werden wir diese Techniken anhand der Befunde aus Untersuchungen an komplexen Systemen und Materialien illustrieren und über mögliche Anwendungen in neuen Bereichen spekulieren, in denen optische Untersuchungen an Einzelmolekülen von Vorteil sein könnten.

## 2. Konzepte und Techniken der Einzelmoleküloptik

Dieser Abschnitt soll eine Einführung in die wichtigsten Konzepte und Techniken der Einzelmoleküloptik geben, um dem Leser das Verständnis der restlichen Abschnitte dieses Aufsatzes zu erleichtern. Tiefergehende Abhandlungen dieser Aspekte der Einzelmoleküloptik, die den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen würden, finden sich in Lit. [15–19].

Ganz allgemein beruhen optische Einzelmolekültechniken auf der Kombination zweier Strategien, um eine selektive Detektion einzelner Moleküle zu erzielen: Der erste wichtige Faktor ist die räumliche Selektivität der optischen Mikroskopie, wobei es erforderlich ist, dass der mittlere Abstand der untersuchten Spezies in einer verdünnten Probe über der Auflösungsgrenze der verwendeten Mikroskopiertechnik liegt. Traditionelle Fernfeldmikroskopische Methoden unterliegen der Beugungsbegrenzung, was grob gesagt die erzielbare Auflösung auf einige hundert Nanometer beschränkt. Mit den experimentell aufwändigeren Nahfeld- und anderen Rastersondentechniken sind dagegen höhere Auflösungen (von einigen zehn Nanometern) erzielbar. Räumliche Selektivität allein genommen reicht allerdings nicht aus, um Auflösungen auf molekularer (Subnanometer-)Skala zu erreichen. Hierzu ist eine Nichtlinearität höherer Ordnung erforderlich, wie sie bei der Korrelation mehrerer Photonen vorhanden ist.<sup>[20]</sup> Eine solche Korrelation kann auf verschiedene Arten erreicht werden. Eine davon ist die spektrale Selektion, die man erzielt, indem man sicherstellt, dass nur das Zielmolekül stark mit dem Anregungslicht in Wechselwirkung tritt. Alle anderen Moleküle, die sich unvermeidlicherweise ebenfalls im



Florian Kulzer wurde 1970 in München geboren. Er erhielt 1995 sein Diplom in Chemie von der Ludwig-Maximilians-Universität München und promovierte 2000 an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Seit 2009 ist er Professor an der Université Claude Bernard Lyon 1, nachdem er zuvor als Postdoktorand am Leidener Institut für Physik (Niederlande) und am Institute of Photonic Sciences (Barcelona) geforscht hatte. Er befasst sich mit der Mikroskopie von einzelnen (Bio-)Molekülen bei unterschiedlichen Temperaturen und optischen Techniken für molekulares Sortieren.



Ted Xia wurde 1977 in Dalian (China) geboren. 2000 erhielt er einen Bachelor-Abschluss in Medizin von der Fachhochschule für Akupunktur und Orthopädie (Beijing) und 2005 einen Master-Abschluss in Biomolekularwissenschaften von der Universität Utrecht (Niederlande). Seit 2005 ist er Doktorand bei Michel Orrit am Leidener Institut für Physik. Seine Forschungsinteressen umfassen die Dynamik einzelner Biomoleküle bei unterschiedlichen Temperaturen und Heterogenitäten in unterkühlten Flüssigkeiten.

optischen Detektionsvolumen aufhalten – sei es als Teil des Lösungsmittels oder der Matrix, in die die Spezies eingebettet ist, sei es das Substrat, auf dem sich die Probe befindet – müssen „transparent“ für die Wellenlänge des Anregungslichts sein, d. h., sie dürfen nur eine sehr geringe Absorptions- oder Streueffizienz aufweisen. Bei tiefen Temperaturen kann die spektrale Selektivität noch erweitert werden, sodass Tausende Moleküle derselben chemischen Spezies im selben beugungsbegrenzten Anregungsvolumen mithilfe ihrer Absorptionsfrequenzen unterschieden werden können.

Die gebräuchlichsten praktischen Umsetzungen dieser allgemeinen Prinzipien beruhen auf der Fluoreszenzmikroskopie: Fluoreszierende Moleküle oder Nanopartikel werden mit einem Laser geeigneter Wellenlänge angeregt; ein wesentlicher Anteil der emittierten Fluoreszenz erfolgt wegen der Stokes-Verschiebung bei höheren Wellenlängen und kann deshalb mithilfe effizienter spektraler Filter vom gestreutem Anregungslicht abgetrennt werden. Zwei wichtige Methoden sind die konfokale Mikroskopie und die Weitfeld-Epifluoreszenz-Abbildung. Bei der konfokalen Mikroskopie wird der Laser auf ein (nahezu) beugungsbegrenztes Volumen fokussiert, und das von der Probe zurückkommende Licht passiert einen räumlichen Filter, der Hintergrundbeiträge von Bereichen unterdrückt, die außerhalb des Anregungsvolumens liegen. Dabei müssen größere Flächen der Probe Punkt für Punkt abgetastet werden, indem der Fokus rasterartig über die Probe geführt und gleichzeitig die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Position aufgezeichnet wird. Beim Weitfeldverfahren wird stattdessen eine ausgedehnte Fläche auf die Pixel eines Charge-coupled-Device (CCD)-Detektors abgebildet, wodurch es möglich ist, eine größere Zahl von einzelnen Chromophoren gleichzeitig zu beobachten. Die oben diskutierten Einschränkungen für die Konzentration von Fluorophoren relativ zum optischen Auflösungsvermögen gelten bei beiden Verfahren.

Verschiedenste Typen von Molekülen können als Fluorophore bei Einzelmolekülexperimenten eingesetzt werden; meist werden Chromophore mit einem ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystem gewählt, die im sichtbaren Frequenzbereich oder in dessen Nähe absorbieren, z. B. Xanthen oder Cyaninfarbstoffe. Außer diesen organischen Fluorophoren hat auch die Klasse der Halbleiternanokristalle an Bedeutung gewonnen.<sup>[21]</sup> Die entscheidenden photophysikalischen Eigenschaften aller Einzelmolekülchromophore sind 1) eine

genügend kurze Fluoreszenzlebenszeit, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Rate an Photonenemissionen erreicht wird, 2) eine geringe Neigung, in „dunkle“ Zustände überzugehen (Tripletzustände, Radikalbildung, ladungstrennte Zustände) und 3) eine geringe Wahrscheinlichkeit dafür, dass die fluoreszierende Struktureinheit durch irreversible photochemische Prozesse zerstört wird.

Neben Fluoreszenztechniken wurden auch andere Methoden für optische Untersuchungen an einzelnen Nanoobjekten vorgeschlagen. Diese haben zwar bisher das letztliche Ziel einer Einzelmoleküldetektion noch nicht erreicht, sind aber erfolgreich bei größeren Nanopartikeln eingesetzt worden, deren optische Eigenschaften sich genügend von denen des umgebenden Mediums unterscheiden. Am häufigsten werden diese Techniken dabei zur Detektion von metallischen Nanopartikeln verwendet. Einige dieser Methoden werden in Lit. [22] behandelt, wo auf verschiedenste nichtlineare Signale eingegangen wird, z. B. die Erzeugung zweiter<sup>[23]</sup> und dritter Harmonischer.<sup>[24]</sup> Zwei-Photonen-angeregte Photolumineszenz<sup>[25]</sup> beruht ebenfalls auf einem nichtlinearen Effekt, ist der Fluoreszenz aber näher verwandt. Detektionsmethoden, die auf linearer Optik basieren, nutzen überwiegend Streuung und werden in Lit. [26] beschrieben. Dunkelfeldstreuung<sup>[27,28]</sup> hat den Vorteil, dass sie leicht zu messen ist und der Hintergrund gering ist. Allerdings verschwindet der Hintergrund nie völlig, und Dunkelfeldstreuung kann nur noch schlecht bei sehr kleinen Partikeln eingesetzt werden, da das Signal quadratisch mit dem Volumen abnimmt. Das Streusignal kleiner Objekte, z. B. 30 nm großer Goldpartikel, kann nicht mehr von dem durch die Rauheit eines normalen Deckglases bewirkten Streusignal unterschieden werden, weshalb die Methode sehr glatte Substratoberflächen erfordert.<sup>[28]</sup> Bei absorbierenden Objekten kann diese Hürde durch den Einsatz von photothermischer Detektion überwunden werden.<sup>[29–31]</sup> Bei diesem Verfahren wird ein absorbierendes Objekt mithilfe von Lichtstreuung an der sich in seiner Umgebung bildenden thermischen Linse erfasst, wodurch sich das Hintergrundsignal unterdrücken lässt. Photothermische Detektion und Verfolgung sind bisher zumeist bei Edelmetallnanopartikeln angewendet worden,<sup>[30–32]</sup> aber auch bei Halbleiternanokristallen<sup>[30]</sup> und Kohlenstoffnanoröhren.<sup>[33]</sup> Sie kann sowohl bei immobilisierten<sup>[29,30,34]</sup> als auch bei frei diffundierenden Objekten<sup>[35–37]</sup> verwendet werden und eröffnet neue Möglichkeiten, komplexe Materie in einer zur Fluoreszenz komplementären Weise zu untersuchen, bei der kein Blinken und Ausbleichen auftritt.

In diesem Aufsatz beschäftigen wir uns mit dem Potenzial, das einzelne Fluorophore und Chromophore als Nanosonden für die Untersuchung der Struktur und Dynamik ungeordneter Umgebungen haben. Grundsätzlich kann jedes Material mit ausreichender optischer Qualität untersucht werden, sofern eine chemisch kompatible Fluoreszenzsonde verfügbar ist, die in einem Spektralbereich angeregt werden kann, in dem das zu untersuchende Material selbst transparent ist. Ein Chromophor kann als Nanosonde fungieren, wenn die Eigenschaften der von ihm emittierten Photonen auf die Struktur seiner Umgebung zurückgeführt werden können. So ermöglicht beispielsweise die Positionsbestimmung eines



Michel Orrit wurde 1956 in Toulouse (Frankreich) geboren. Er studierte Physik an der École Normale Supérieure in Paris und ging 1979 an das C.N.R.S in Bordeaux. 1984 legte er seine Thèse d'État vor. 1985/86 arbeitete er mit H. Kuhn und D. Möbius am MPI für biophysikalische Chemie (Göttingen). Zurück in Bordeaux begann er 1990 mit Einzelmolekül-Fluoreszenz-Experimenten bei tiefen Temperaturen. Seit 2001 ist er Professor an der Universität Leiden (Niederlande). Er beschäftigt sich mit optischer Spektroskopie und Mikroskopie an Einzelmolekülen und Halbleiter- und Metallnanopartikeln und deren Anwendungen zur Untersuchung weicher und biologischer Materialien.

Fluorophors, die mit einer höheren Genauigkeit als die beugungsbegrenzte Auflösung erfolgen kann, die Verfolgung von Molekülbewegungen und damit z.B. die Messung lokaler Viskositäten. Vergleichbare Informationen lassen sich aus der Rotationsdiffusion eines Sondenmoleküls ableiten, die sich durch eine Analyse der Fluktuationen der Polarisation der emittierten Fluoreszenz bestimmen lässt. Andere Phänomene, die sich auf die spektralen Eigenschaften der Einzelmolekülfluoreszenz und/oder die zeitabhängige Emissionscharakteristik auswirken, schließen lokale elektrische und magnetische Felder, Deformationen, den effektiven Brechungsindex, Energietransfer und Variationen der lokalen Zustandsdichte ein. In Abschnitt 3 werden wir anschauliche Beispiele dieser Effekte besprechen.

### 3. Anwendungen von Einzelmolekültechniken

In den letzten zehn Jahren sind Hunderte von Publikationen über die Anwendung von Einzelmolekülmethoden zur Untersuchung komplexer und weicher Materie erschienen. Es ist hier nicht unser Ziel, auf jede einzelne dieser Veröffentlichungen einzugehen; stattdessen diskutieren wir einige wenige, besonders wichtige Beispiele im Detail und verweisen, soweit möglich, auf ausführlichere Übersichtsartikel zu den verschiedenen Themenbereichen. Wir hoffen, dass die folgenden Beispiele die grundlegenden Konzepte illustrieren und den Leser damit auf zukünftige Anwendungen von Einzelmolekülmethoden vorbereiten.

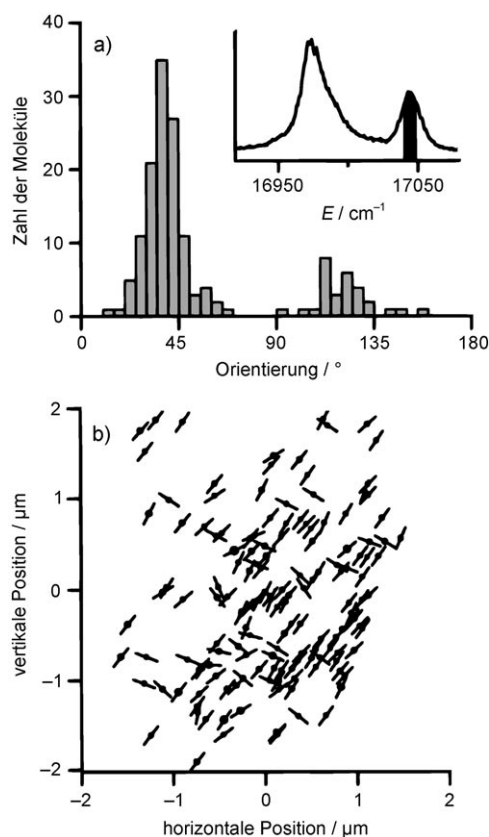
#### 3.1. Statische Unordnung in Kristallen und Schpolksi-Matrices

Ein organischer Gastchromophor kann eines oder mehrere Wirtmoleküle in einem molekularen Kristall ersetzen, falls eine kompatible Wirt-Gast-Kombination vorliegt. Wenn solche Proben bei niedrigen Temperaturen untersucht werden, beobachtet man im Allgemeinen eine kleine Zahl von spektral unterscheidbaren Einbaueometrien. Jede dieser Einbaulagen erzeugt eine um eine Mittenfrequenz zentrierte Absorptionsbande, die aufgrund von Defekten verbreitert ist. Die Verteilung von Absorptionsfrequenzen für dieselbe chemische Spezies in einer vereinfachend als überall gleich und wohldefiniert angenommenen Umgebung wird als inhomogene Verbreiterung bezeichnet. Dieses Phänomen beobachtet man selbst bei sorgfältig hergestellten Proben, und es kann bei ausreichend niedrigen Konzentrationen dazu genutzt werden, einzelne Fluorophore spektral aufzulösen, selbst wenn eine räumliche Trennung im mikroskopischen Fokalvolumen nicht möglich ist. Die Frage nach den Ursachen und genauen Eigenschaften der inhomogenen Verbreiterung gehört zu den beständigen und schwierig zu beantwortenden Fragen bei der optischen Spektroskopie an molekularen Kristallen. Kristalldefekte und Spannungsfelder, die durch andere Verunreinigungen bewirkt werden, verzerren offensichtlich die intermolekularen Abstände geringfügig und verschieben dadurch die spektralen Positionen der elektronischen Übergänge einer absorbierenden Verunreinigung in einer komplizierten Art und Weise. Die Messung der

spektralen Positionen einzelner Moleküle in molekularen Mischkristallen bei tiefen Temperaturen ist einfach, von Interesse wäre jedoch, die spektralen Verschiebungen mit anderen molekularen Parametern wie der Orientierung von Übergangsdipolmomenten einzelner Verunreinigungen korrelieren zu können, um so neue Einblicke in die Ursachen und das Ausmaß spektraler Inhomogenität und der Beschaffenheit mikroskopischer Unordnung in Mischkristallen zu erhalten.

Schon die Orientierungsverteilung einzelner Dotierungsmoleküle liefert wichtige Informationen. Solche Verteilungen sind in den verschiedensten kristallinen Wirten gemessen worden: in aromatischen Mischkristallen,<sup>[38,39]</sup> Schpolski-Matrices (schockgefrorenen Lösungen von organischen Fluorophoren in *n*-Alkanen geeigneter Länge, bei denen davon ausgegangen wird, dass sie mikroskopische kristalline Domänen aufweisen)<sup>[40,41]</sup> und Kaliumhydrogenphthalat.<sup>[42]</sup> Ein Beispiel einer solchen Messung an einem Schpolski-System ist in Abbildung 1 zu sehen.

Die beobachteten Winkelverteilungen sind im Allgemeinen deutlich breiter (10–30°), als man es anhand der Qualität



**Abbildung 1.** Orientierung und laterale Position (bestimmt mit einer Genauigkeit von 23 nm) von Dibenzo[*b,h*]anthanthren(DBATT)-Molekülen in *n*-Tetradecan. Moleküle aus einem Volumen von 10 µm<sup>3</sup> wurden frequenzselektiert. a) Histogramm der Orientierungen von 151 DBATT-Molekülen, aus dem höherenergetischen Bereich ausgewählt, wie im Ensemblespektrum im Einschub markiert. b) Relative laterale Positionen (Kreise) zusammen mit den Orientierungen (Balken) derselben 151 DBATT-Moleküle. Die Kreisradien repräsentieren die Genauigkeiten der einzelnen Positionen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [41], Copyright 2002, American Institute of Physics.

der Kristalle erwarten würde. Diese Beobachtung ist bisher noch nicht vollständig verstanden; als Erklärung schlagen wir vor, dass die Fluktuationen der Übergangsdipolvektoren wesentlich größer sind als die der Molekülachsen. Kleine Fluktuationen der relativen Position des Moleküls können zu großen Variationen der Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast führen, wodurch es zu einer Mischung der elektronischen Zustände des Gastes mit den zugehörigen Übergangsdipolmomenten kommt. Von ähnlich kleinen transienten Variationen der intermolekularen Abstände wird angenommen, dass sie Fluktuationen der Übergangsdipolmomente einzelner Fluorophore in Polymerwirten nahe des Glasübergangs induzieren, aus denen Fluktuationen der Fluoreszenzlebensdauer resultieren.<sup>[43,44]</sup> Solche Fluktuationen der Dipolgröße dürften von Fluktuationen der Dipolausrichtung begleitet sein. Eine Diskussion der Korrelation zwischen der inhomogenen Breite und den für den Stark-Effekt von Einzelmolekülen verantwortlichen statischen Dipolen findet sich in der Literatur.<sup>[39,45]</sup> Zwar können sowohl die räumliche als auch die Orientierungsordnung in Einkristallwirlen sehr hoch sein, allerdings können kleine Abweichungen in den intermolekularen Abständen wegen der Empfindlichkeit der elektronischen Wellenfunktion verstärkt werden und so die spektroskopischen Observablen empfindlich von den Molekülpositionen abhängen. Dies zeigt, dass die optische Spektroskopie ein empfindlicher, wenn auch indirekter Indikator für die Struktur der Einbaulagen auf der molekularen Ebene ist, wobei eine präzise Beschreibung derzeit allerdings noch nicht vorliegt.

### 3.2. Orientierungsdynamik und lokale Mobilität in unterkühlten molekularen Flüssigkeiten

Die Mobilität eingebetteter Chromophore kann dazu genutzt werden, die lokale Viskosität des Gastmaterials zu untersuchen, aus der auf den Grad der Strukturinhomogenität und die Präsenz von Gedächtnis- und Alterungseffekten geschlossen werden kann. Indem man die Veränderung der Orientierung einzelner Sondenmoleküle mit der Zeit verfolgt, kann man eine Rotationskorrelationszeit bestimmen, die mit dem hydrodynamischen Volumen  $V_H$  der (als eine Kugel angenäherten) Sonde und der lokalen Viskosität  $\eta$  zusammenhängt. Durch Anwendung der Stokes-Einstein-Debye-Beziehung [Gl. (1);  $\tau_R$  = Rotationskorrelationszeit]

$$\tau_R = \frac{\eta V_H}{k_B T} \quad (1)$$

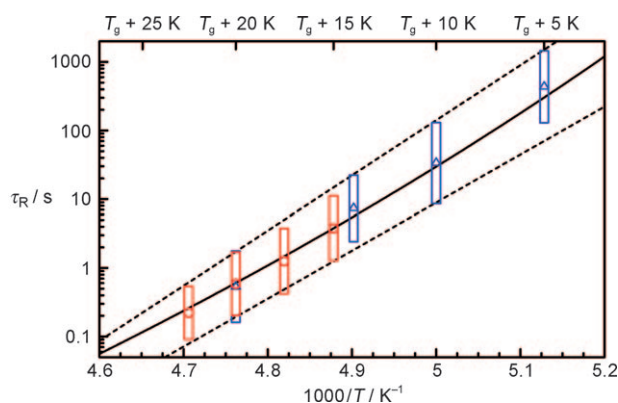
erhält man die lokale Viskosität des Gastes. Solche lokalen Sondierungen sind besonders dann interessant, wenn sich das Medium weder in einem festen noch in einem flüssigen Zustand befindet oder im Bereich direkt oberhalb des Glasübergangs. Unterhalb des viskosimetrischen Glaspunktes ist die Lösung normalerweise vollständig gefroren, und die meisten Sonden sind bewegungsunfähig. Anders ausgedrückt: Bewegungen mit großer Amplitude, wie sie für die Reorientierung eines sperrigen Sondenmoleküls notwendig wären, werden unwahrscheinlich. Eine ganze Reihe glasbil-

dender Systeme ist bisher untersucht worden, von vermeintlich einfachen unterkühlten molekularen Flüssigkeiten wie *o*-Terphenyl und Glycerin bis hin zu Polymeren, die wir getrennt in Abschnitt 3.3 diskutieren werden.

Bei den bisher untersuchten glasbildenden Systemen lassen alle Einzelmolekülexperimente übereinstimmend auf einen hohen Grad an dynamischer Heterogenität auf der molekularen Ebene schließen. Bei einer typischen Einzelmolekülmessung sind die Sondenmoleküle mehrere Mikrometer voneinander entfernt, und ihre Orientierung wird über den mit der Zeit variierenden linearen Dichroismus ihrer Fluoreszenz oder manchmal auch ihrer dreidimensionalen Polarisierung verfolgt. Jedes der einzelnen Moleküle weist zwar eine definierte Korrelationszeit seiner Taumelbewegung auf (zumindest über Zeiträume, die mehreren Reorientierungen entsprechen), allerdings wurde festgestellt, dass sich diese Korrelationszeiten deutlich voneinander unterscheiden, d.h. von der Position in der Probe abhängen. Diese Beobachtung widerspricht der Vorstellung, dass eine unterkühlte Flüssigkeit ihre Erinnerung an lokale Fluktuationen auf der Rotationszeitskala eines Flüssigkeitsmoleküls verliert, die in der Regel wesentlich kürzer ist als die der Sonde. Die verschiedenen Taumelgeschwindigkeiten demonstrieren also direkt die dynamische Heterogenität der Probe; die Diffusionsgeschwindigkeiten der Orientierung der Sonden unterscheiden sich an verschiedenen Orten in der Probe. Es scheint auch eine weitgehende Übereinstimmung über das Ausmaß der Heterogenitäten und des Anwachsens ihrer relativen Größen zu geben, wenn sich die Temperatur jener des Glasübergangs annähert. Abbildung 2 zeigt die Wirkung dieses Effekts auf die Rotationskorrelationszeit von Perylendimid-(PDI)-Molekülen in unterkühltem Glycerin in der Nähe seiner Glasübergangstemperatur.

Auf größeren Zeitskalen ist zu erwarten, dass jedes Sondenmolekül verschiedene lokale Viskositäten erfährt, sei es wegen der Diffusion der Sonde an eine andere Position, durch Änderungen der lokalen Umgebung durch Fluktuationen der Probe um ihren Gleichgewichtszustand oder wegen Alterungseffekten. Dieses Szenario wird als Umgebungsaustausch (environmental exchange) bezeichnet. Es bestehen allerdings deutliche Unterschiede bei in verschiedenen Experimenten bestimmten Zeitskalen dieses Austauschs, die stark von der verwendeten Probe und ihrer thermischen Vorgeschichte abzuhängen scheinen. Vanden Bout und Deschenes bestimmten Austauschzeiten in der Größenordnung von einigen Zehnfachen der Taumelzeiten in *o*-Terphenyl,<sup>[48]</sup> während Zondervan et al.<sup>[47,49]</sup> bei ihrer Untersuchung an im unterkühlten Zustand gealtertem Glycerin fast keinen Umlaustausch nachweisen konnten, was sie wiederum zu einer Abschätzung der Austauschzeit führte, die mindestens um den Faktor 1000000 größer ist als die Taumelzeit der Glycerinmoleküle selbst ( $\alpha$ -Relaxationszeit). Einzelmolekülundersuchungen zeichnen also ein heterogenes Bild glasbildender unterkühlter Flüssigkeiten, bei denen festkörper- und flüssigkeitsartige Anteile koexistieren. Man kann sich dieses Gemisch viskoser und fester Bestandteile in etwa wie Hüttenkäse (einen Streichkäse mit körniger Struktur) vorstellen. Offensichtlich könnten Umlagerungen der festkörper- und flüssigkeitsartigen Anteile kinetisch oder geometrisch gehin-





**Abbildung 2.** Arrhenius-Darstellung der Rotationskorrelationszeiten  $\tau_R$  von PDI-Molekülen in unterkühltem Glycerin. Die Heterogenität der unterkühlten Flüssigkeit spiegelt sich in der breiten Verteilung der Tauselzeiten wider, die durch die von den einzelnen PDI-Moleküle erfahrenen unterschiedlichen Viskositäten bewirkt wird. Dreiecke und Kreise markieren die Zentren der logarithmischen Normalverteilungen, die sich aus einer Anpassung an die Rotationszeiten aus zwei verschiedenen Messperioden ergeben; Balken um die Zentren repräsentieren die vollen Breiten bei halbem Maximum (FWHM) der jeweiligen Verteilungen. Die durchgezogene Kurve zeigt, dass die Werte für die Zentren mit der bekannten Temperaturabhängigkeit der Viskosität von Glycerin<sup>[46]</sup> und einem hydrodynamischen Volumen von  $0.45 \text{ nm}^3$  [wie in G. (1) verwendet] konsistent sind. Die beiden gestrichelten Kurven zeigen das Arrhenius-Verhalten ( $\log(\tau_R) \propto 1/T$ ) an den oberen und unteren Grenzen des FWHM-Bereichs und sollen die relative Verbreiterung der Verteilungen bei Annäherung an die Glasübergangstemperatur ( $T_g = 190 \text{ K}$ ) sichtbar machen. Die Werte bei  $195 \text{ K}$  sind durch den Einfluss von Photobleichen, das durch die erforderliche lange Messzeit hervorgerufen wurde, verschoben und wurden deshalb bei der Anpassung nicht berücksichtigt. Die Abbildung beruht auf bereits in Lit. [47] publizierten Daten.

dert sein, wodurch lokale Alterungseffekte stark von der lokalen Struktur und den dortigen Bedingungen abhängig wären.

Über Informationen zu Heterogenitäten in der Nähe des Glasübergangs hinaus könnten Einzelmolekültechniken auch Antworten auf viele offene Fragen über den Glasübergang selbst liefern. Wie groß sind die Korrelationszeiten und -längen der dynamischen Inhomogenitäten? Die Verfolgung von Einzelmolekülen mit Auflösungen im Sub-Wellenlängenbereich<sup>[50]</sup> könnte dabei helfen, die durch Diffusion der Einzelmoleküle abgetasteten Regionen abzubilden. Was ist die Struktur der festkörper- und flüssigkeitsartigen Bereiche? Im Fall einfacher Flüssigkeiten wie Glycerin oder *o*-Terphenyl könnte man erwarten, dass die festkörperartigen Anteile aus Mikro- oder Nanokristallen bestehen, die viele Abschreckungsdefekte und Domänen aufweisen, die auf experimentell zugänglichen Zeitskalen nicht ausheilen können. Komplexere Systeme wie Polymere können zwar keine Kristalle bilden, aber die Koexistenz von dichteren mit stärker fluiden Regionen könnte zu einer stark heterogenen Dynamik der gleichen Art führen. Wie würde eine Kompositmikrostruktur sich auf die Eigenschaften der unterkühlten Flüssigkeit auf größerer Längenskala auswirken, besonders auf ihre Fließeigenschaften? Ist es möglich, die Alterungsprozesse des Materials und eine mögliche Trennung in fest-

körper- und flüssigkeitsartige Regionen zu verfolgen, z.B. durch die Verwendung angepasster Sonden, die speziell darauf ausgelegt sind, sich in die eine oder andere Fraktion einzulagern? Für alle diese Fragen könnten Einzelmolekülverfahren Daten aus erster Hand liefern oder gar zu einer Umformulierung der jeweiligen Frage führen.

### 3.3. Einzelmoleküluntersuchungen an Polymeren

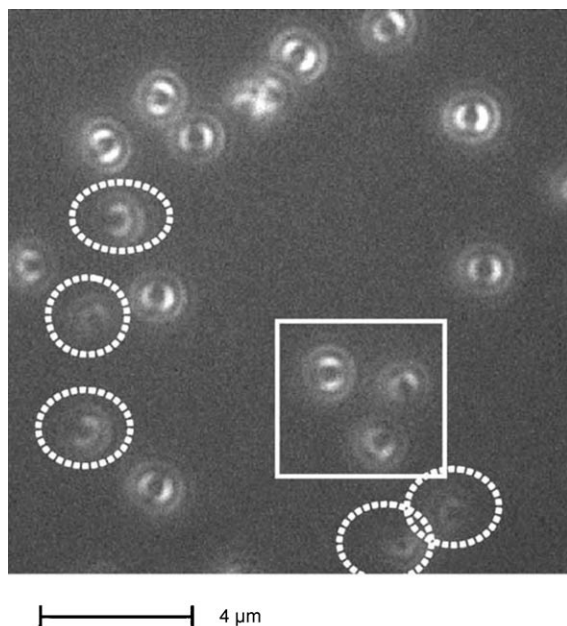
Die Struktur und Dynamik von Polymeren wirft eine ganze Reihe von Fragen auf, die nicht nur wegen der vielfältigen Materialanwendungen von Polymeren wichtig sind, sondern auch wegen der grundlegenden Bedeutung von Polymeren in der physikalischen Chemie und der molekularen Biologie. Einzelmolekültechniken bieten eine einzigartige Möglichkeit, die Physik der Polymere auf der Nanometer-ebene zu untersuchen. Wöll et al. haben hierzu vor kurzem einen Übersichtsartikel publiziert,<sup>[51]</sup> den wir allen Lesern empfehlen möchten, deren Interesse über die folgende kurze Zusammenfassung hinausgeht.

In einer der ersten Anwendungen von Polymeren bei Einzelmoleküluntersuchungen wurden diese genutzt, um Farbstoffmoleküle sowohl bei tiefer<sup>[52]</sup> als auch bei Raumtemperatur<sup>[7,9,53]</sup> zu immobilisieren. Die meisten Polymere sind amorphe Materialien, die ähnliche strukturelle und dynamische Eigenschaften wie Gläser aufweisen, vom Fehlen einer Fernordnung bis hin zur exponentiellen Verlangsamung der Relaxation bei Annäherung an den Glasübergang.<sup>[54]</sup> In Experimenten bei sehr tiefen Temperaturen bewirkt die ungeordnete Struktur eines Polymers, dass eine kleine Zahl zufällig orientierter Bereiche existiert, zwischen denen isoenergetische Umlagerungen erfolgen können. Thermisch induzierte Sprünge zwischen verschiedenen Konformationen erfolgen hauptsächlich durch Tunnelübergänge und können als Sprünge eines Systems mit zwei Zuständen modelliert werden.<sup>[55]</sup> Diese niederenergetischen Anregungen führen zu entsprechenden Verschiebungen der optischen Einzelmoleküllinien,<sup>[52,56,57]</sup> was als spektrale Diffusion bezeichnet wird. Bei höheren Temperaturen (aber noch unterhalb des Glasübergangs) beeinflusst die spektrale Diffusion die Fluoreszenz- und Absorptionsspektren der Moleküle<sup>[14,58]</sup> und deren photophysikalische Eigenschaften (siehe Abschnitt 3.5). Das Beispiel molekularer Kristalle legt nahe, dass auch in ungeordneten Systemen wie Polymeren die Winkelverteilung der Absorptionsachsen von Einzelmolekülen kein genaues Abbild der molekularen Orientierungsverteilung darstellt.<sup>[59–63]</sup>

Die lokale Dynamik von Polymeren ist auch mit fluoreszierenden Einzelmolekülsonden untersucht worden. Die beobachteten Fluktuationen der Fluoreszenzlebensdauern der Sonden wurden mit lokalen Umordnungen des freien Volumens im Polymer in der Nähe des Sondenmoleküls in Zusammenhang gebracht,<sup>[44,64]</sup> die zu Änderungen des Übergangsdipolmoments führen.<sup>[43]</sup> Lokale Umordnungen können durch zwei Arten von Relaxation im Polymer erfolgen:  $\alpha$ -Relaxationen, die eine korrelierte Bewegung einer großen Zahl von Molekülen erfordern und zur Divergenz der makroskopischen Viskosität beim Glasübergang führen, und  $\beta$ -

Relaxationen, die für die Bewegung von Untereinheiten des Polymers und deren lokalisierte Schwingungen charakteristisch sind.

Die Rotationsdiffusion von Farbstoffmolekülen in Polymeren wurde anhand ihrer Fluoreszenzpolarisation untersucht.<sup>[65,66]</sup> Schob et al.<sup>[66]</sup> erforschten auch Translationsdiffusion und fanden, dass die in der Nähe des Glasübergangs  $T_g$  beobachtete Heterogenität bei Temperaturen oberhalb von  $1.2 T_g$  nicht erhalten blieb. Eine dreidimensionale Methode zur vollständigen Orientierungsverfolgung mithilfe defokussierter Abbildung wurde von Uji-i et al.<sup>[67]</sup> bei einer Studie von PDI-Molekülen in dünnen Filmen aus Polymethylacrylat verwendet, deren Ergebnisse in Abbildung 3 dargestellt sind. Diese Autoren beobachteten einen großen Bereich dynamischer Verhaltensweisen, von isotroper Diffusion bis hin zu Molekülen mit eingefrorener Orientierung, Wechsel zwischen verschiedenen Regimes und Umweltaustausch mit langsamer bis schneller Diffusion. All dies demonstriert eine komplexe räumliche und zeitliche Heterogenität, die zu den in Experimenten an größeren Ensembles von Molekülen in anderen Glasbildnern gefundenen, durch gestreckte Exponentialfunktionen beschriebenen Winkelkorrelationen führen. In zukünftigen Untersuchungen sollte die Rotationsdiffusion mit translatorischer Diffusion, die mithilfe höchstauflösender Techniken erfasst wird, kombiniert werden, insbesondere um das Translations-Rotations-Paradoxon<sup>[68a]</sup> besser zu verstehen. Das Translations-Rotations-Paradoxon wird mit der Annäherung an den Glasübergang in Verbindung gebracht.



**Abbildung 3.** Defokussierungsabbildung von PDI-Molekülen, eingebettet in einem 50 nm dicken Film aus Polymethylacrylat, aufgenommen mit 1  $\mu\text{m}$  Defokussierung in Richtung der Probe. Die Auswertung der einzelnen Muster ergibt die dreidimensionale Orientierung des Übergangsdipolmoments des entsprechenden PDI-Chromophors. Die weißen, gestrichelten Kreise markieren Moleküle, die eine überwiegend aus der Ebene herauszeigende Orientierung aufweisen. (Die angezeigten Moleküle werden in der ursprünglichen Publikation weiter diskutiert.) Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [67], Copyright 2006 Elsevier Ltd.

Etliche Messungen deuten darauf hin, dass Sondenmoleküle in einem Glasbildner in diesem Temperaturbereich eine schnellere Translationsdiffusion aufweisen können, als man aufgrund ihrer Rotationsdiffusion eigentlich erwarten würde.<sup>[68b]</sup>

Außer der Untersuchung von Polymeren mithilfe kleiner Farbstoffmoleküle ist auch von Interesse, die Bewegungen einzelner fluoreszierender Polymerketten in konzentrierter Lösung oder Schmelze zu verfolgen. Erste Studien mit fluoreszierenden Polymerketten erfolgten mit markierter DNA,<sup>[69]</sup> die auch als Bezugsgröße zum Vergleich mit theoretischen Beschreibungen und numerischen Simulationen dienen kann,<sup>[70]</sup> sowie mit konjugierten Polymeren (siehe Lit. [71]), bei denen das emittierende Polymer in einer Matrix aus gesättigten Polymeren eingebettet war. Neuere Studien konzentrieren sich auf fein in einer Matrix unmarkierter Polymerketten verteilte, fluoreszenzmarkierte Polymere, die mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)<sup>[72]</sup> oder, bei sehr langen Ketten, durch bildgebende Techniken<sup>[73]</sup> untersucht wurden. Die Dynamik der markierten Kette kann dann mit dem theoretischen Modell von Zimm und Rouse sowie dem Reptations-Modell verglichen werden.<sup>[74]</sup>

Die Dynamik von Proteinen muss gesondert behandelt werden, da diese Polymere weder zufällig noch homogen angeordnet sind. Einzelmolekülmessungen an verschiedenen Proteinen<sup>[14,75,76]</sup> haben überzeugende Belege für die starke zeitliche Heterogenität der Proteindynamik geliefert.<sup>[77,78]</sup> Die vielfältigen Konformationen eines Proteins werden durch eine komplexe Potentialfläche bestimmt,<sup>[79]</sup> deren Minima durch Aktivierungsbarrieren mit sehr unterschiedlichen Höhen voneinander getrennt sind. Da die Hopping-Korrelationszeit exponentiell von der Höhe der Barriere abhängt, ergibt sich eine auf logarithmischer Skala breite Verteilung der Relaxationsraten im Protein mit daraus resultierenden „stretched kinetics“, wie sie auch aus den langen Relaxationsschwänzen in Experimenten an Ensembles erkennbar sind.<sup>[80]</sup>

### 3.4. Translations- und Rotationsdiffusion in heterogenen Materialien

Flüssigkeiten in der Nähe von Grenzflächen oder in enge Festkörperporen eingeschlossene Flüssigkeiten können ebenfalls eine komplexe Dynamik zeigen, die sich mit Einzelmolekülmethode auf der Nanometerebene untersuchen lässt. Von Borczykowski et al. untersuchten Einzelmoleküle in dünnen Siliconölfilmen, die eine Festkörperoberfläche benetzen,<sup>[81–83]</sup> und fanden dabei Hinweise auf Schichtbildungen, einen ausgedehnten Vorstufenfilm und differentielle Diffusion innerhalb der Schicht (oder im Raum zwischen den Schichten), mit langsamen Sprüngen zwischen den Schichten. Diese Untersuchungen wurden kürzlich von Cichos und Schob um mechanische Messungen mithilfe eines Geräts zur Bestimmung von Oberflächenkräften erweitert.<sup>[84]</sup>

Einzelmoleküle eignen sich besonders für das Studium inhomogener Materialien, z.B. Siliciumdioxid-basierter Materialien, wie sie in Sol-Gel-Prozessen entstehen. Vielzahl Artikel, darunter auch zu Einzelmolekülundtersuchungen,



beschäftigen sich mit diesem wichtigen Thema und wurden von Ye et al.<sup>[85]</sup> hervorragend zusammengefasst. Erste Studien zur Molekülmobilität ergaben, dass sie von der Art des Siliciumdioxids, von der Gegenwart organischer Gruppen, von Tensidrückständen sowie vom Wassergehalt abhängt. Unterschiedliche Subpopulationen mit verschiedenen Diffusionskoeffizienten lassen sich nachweisen, zum Teil mit deutlich erkennbarer Unterscheidung zwischen diffundierenden und gefangenen Molekülen. Sackgassen in Kanälen und Einschlüsse in zwei und drei Dimensionen können zu anomaler Diffusion (Subdiffusion) führen. Besonders detaillierte Untersuchungen der Bewegungen von Einzelmolekülsonden in dünnen Filmen meso- und nanoporöser Siliciumdioxidmaterialien wurden von Bräuchle et al. durchgeführt.<sup>[86–92]</sup> Beispiele für Einzelmoleküldiffusionspuren in diesen Materialien sind in Abbildung 4 dargestellt. Diffusionswege konnten mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen korreliert werden und bestätigten so die eindimensionale Diffusion von Sonden in Nanokanälen und die zweidimensionale Diffusion an der Filmoberfläche.

Eine weitere interessante Methode zur Sondierung der Umgebung besteht darin, die spektrale Empfindlichkeit bestimmter Farbstoffe zu nutzen. So ist z.B. Nilrot sehr empfindlich für die Polarität seiner Umgebung, und aus Verschiebungen und Breitenänderungen der Absorptions- und Emissionsspektren lassen sich Informationen über lokale statische und dynamische Polaritätsfluktuationen ableiten.<sup>[93]</sup> Ähnliche Studien konzentrierten sich auf die Bestimmung von Fluktuationen der Acidität in der Matrix mit Einzelmolekülen als lokalen pH-Indikatoren.<sup>[94]</sup> Diese Untersuchungen fanden oft breite Verteilungen des  $pK_S$ -Werts in Abhängig-

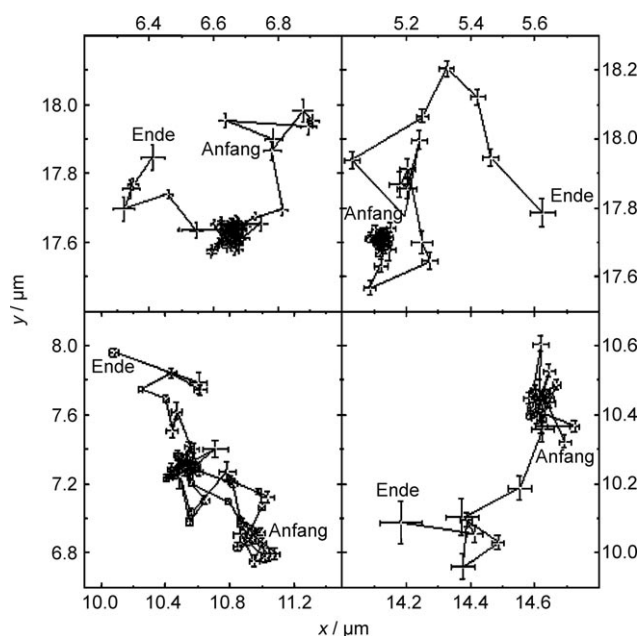
keit von der lokalen Umgebung. Diese Studien unterstreichen das große Ausmaß der Heterogenität in diesen Materialien, das auf der Einzelmolekülebene sofort augenfällig wird.

### 3.5. Photophysik und Blinken

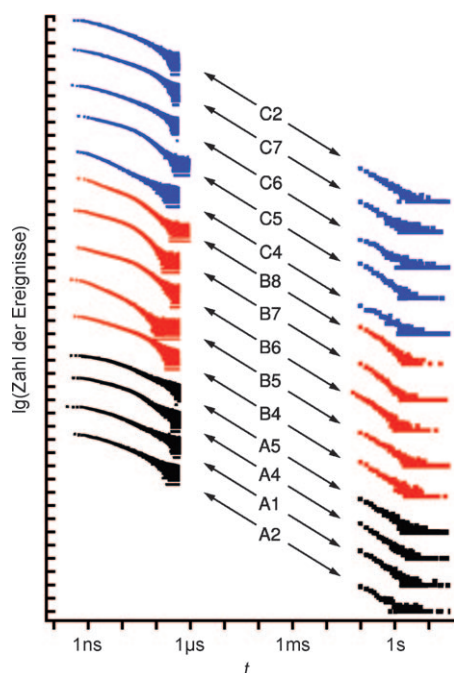
Angeregte Moleküle können verschiedenste photochemische und photophysikalische Prozesse durchlaufen, von normalen Photoreaktionen wie Additionen und Photooxidation bis hin zu photoinduzierten Ladungstransfers, die weniger ausgeprägte Molekülmordnungen nach sich ziehen. Intramolekulare Prozesse wie Isomerisierung (und sogar intersystem crossing) hängen häufig stark von der Umgebung des Moleküls ab, insbesondere von deren Polarität und Rigidität. Deswegen ist es im Allgemeinen schwierig, zwischen intrinsischen (den Chromophor betreffenden) und extrinsischen (die Umgebung betreffenden) Prozessen zu unterscheiden, wie es in Lit. [58] vorgeschlagen wurde. Die Klasse von Reaktionen, an denen ein Elektronentransfer von oder zu der Umgebung beteiligt ist, ist bedeutsam für die Lebensdauer von Fluoreszenzmarkern.<sup>[95,96]</sup> Die Untersuchung dieser Reaktionen könnte zu verbesserten Farbstoffen mit höherer Resistenz gegen ein Photobleichen führen, das derzeit noch die Verwendbarkeit von Fluorophoren für konfokale und höchstauflösende Bildgebung einschränkt.<sup>[50]</sup>

Die oben genannte Klasse reversibler Photoreaktionen oder photoinduzierter Umordnungen ist die Ursache für das Blinken, also die Prozesse, bei denen die Fluoreszenzintensität eines Einzelemitters zwischen hohen und niedrigen (häufig bei null liegenden) Werten hin- und herwechselt. Diese Übergänge begrenzen die Helligkeit von Fluorophorenensembles und bewirken charakteristische An- und Auszeiten bei den zeitlichen Aufzeichnungen der Intensität von Einzelemittlern verschiedenster Art. Eine offensichtliche Ursache für das Blinken, die bereits beim ersten Einzelmolekülexperiment<sup>[97]</sup> erkannt wurde, sind durch intersystem crossing bewirkte Übergänge in die Triplettzustände oder aus den Triplettzuständen aromatischer Moleküle. Dieser Mechanismus führt allerdings zu einer monoexponentiellen Verteilung der An- und Auszeiten. (Bei Temperaturen, die tief genug sind, um thermische Mischungen der Triplettunterniveaus zu verhindern, können die Auszeiten auch eine biexponentielle Verteilung aufweisen.) Die Beobachtung sehr langer Auszeiten bei Molekülen<sup>[98,99]</sup> und einer äußerst breiten Verteilung der An- und Auszeiten bei Halbleiternanokristallen,<sup>[100–102]</sup> wie sie in Abbildung 5 dargestellt ist, war deshalb überraschend.

In diesen Fällen lässt die nur schwach ausgeprägte Temperaturabhängigkeit des Blinkens darauf schließen, dass Ladungstrennung und -transfer der für das Blinken entscheidende Mechanismus ist, und nicht normale Photochemie.<sup>[103,104]</sup> Für Moleküle konnte eine Ladungstrennung durch magnetische Resonanzexperimente an Ensembles nachgewiesen werden.<sup>[104]</sup> Darüber hinaus zeigten Experimente an Nanokristallen<sup>[100,101]</sup> und später auch an Molekülen,<sup>[105–108]</sup> dass die Verteilung der An- und Auszeiten im Bereich von Mikrosekunden bis Minuten einem Potenzgesetz folgt. Der Mechanismus hinter diesem erstaunlichen und nahezu uni-



**Abbildung 4.** Vier charakteristische Diffusionsspuren von Streptocyaninmolekülen in einem nanoporösen Siliciumdioxidgel mit einer durchschnittlichen Porengröße von 3 nm. Die Spuren zeigen abwechselnde Perioden freier Diffusion und zusammenliegender Datenpunkte (Trapping), von denen jede mehrere Sekunden dauerte. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [86], Copyright 2004 American Chemical Society.



**Abbildung 5.** Zeitaufgelöste Lumineszenz (Nano- bis Mikrosekunden) und Histogramm der für Blinken gemessenen Daten (Millisekunden bis Minuten) für 14 verschiedene Nanokristalle, dargestellt über gemeinsamer logarithmischer Achse. (Typ A: reine CdSe-Nanokristalle, Typ B: CdSe/ZnS- Kern-Schale-Strukturen, Typ C:  $\text{Zn}_{0.5}\text{Cd}_{0.5}\text{S}/\text{CdSe}/\text{ZnS}$ -Dreilagenteilikel.) Die Teilstriche an beiden Achsen entsprechen einem Faktor 10. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [102], Copyright 2008, American Institute of Physics.

versellen Verhalten wird noch intensiv diskutiert.<sup>[109–111]</sup> An dieser Stelle möchten wir auf einen eigenartigen Aspekt des dem Potenzgesetz folgenden Blinkens eingehen: Es wird ausschließlich in Materialien beobachtet, die zumindest einen gewissen Grad an Unordnung aufweisen: Oberflächen,<sup>[107]</sup> Gläser und Polymere<sup>[105,106,108]</sup> sowie ungeordnete Kristalle.<sup>[42,112,113]</sup> Dagegen findet man es weder in geordneten molekularen Kristallen<sup>[114]</sup> noch in Diamanten,<sup>[115]</sup> bei durch Selbstorganisation entstandenen Punkten heteroepitaxialer Strukturen<sup>[116,117]</sup> oder in Nanokristallen mit genügend dicker Schale.<sup>[118,119]</sup> Wenn das einschließende Potential „weich“ ist, treten Auger-Prozesse seltener auf, und der geladene Kristall kann weiter fluoreszieren.<sup>[120]</sup> Blinken scheint daher in enger Beziehung zur Umgebungsstruktur zu stehen und könnte deshalb zu deren Untersuchung genutzt werden. Falls, wie wir glauben, Blinken in rigiden Umgebungen durch Ladungstransfer mit anschließendem self-trapping<sup>[\*]</sup> in der direkten Umgebung des Emitters bewirkt wird<sup>[121,122]</sup> und ein schließlich erfolgreicher Rücktransfer die Lumineszenz wiederherstellt, dann könnten aus den statistischen Daten des Blinkens

[\*] Self-trapping eines Ladungsträgers, z. B. eines Elektrons, in einem sonst homogenen Material, z. B. einem Kristall, wird durch die lokale Deformation der Umgebung durch das elektrische Feld des Ladungsträgers verursacht. Das sich hierbei bildende Fallenpotential fixiert den Ladungsträger, ähnlich zum Einsinken eines schweren Balls auf einer flachen Gummimembran.

Einblicke in die Potentialfläche des übertragenen Elektrons in dieser Umgebung gewonnen werden. Solche Informationen sind wegen der Heterogenität der ungeordneten lokalen Umgebung nur äußerst schwer mit Ensemblemethoden zu erhalten.

Wie wir gesehen haben, ist das Blinken eines einzelnen Nanokristalls oder Moleküls in einem ungeordneten Festkörper ein komplexes Phänomen. Bei Raumtemperatur und in Gegenwart einer flüssigen Phase können viele reaktive Spezies diffundieren, und die Situation wird durch die Vielfalt möglicher Redox- und anderer Sekundärreaktionen noch undurchsichtiger. Zum Beispiel wird das Blinken von Quantenpunkten an einer Grenzfläche zwischen einem Festkörper und einer Lösung offenkundig durch die Änderung der Zusammensetzung oder des Redoxpotentials der Lösung<sup>[122–125]</sup> oder durch die Gegenwart eines anderen Farbstoffs in einer bichromophoren Verbindung beeinflusst. Solche Verbindungen zeigen ein Schaltverhalten, das durch Licht angetrieben werden kann.<sup>[126]</sup> Diese Umschaltreaktion wird bereits für höchstauflösende Bildgebung genutzt.<sup>[127,128]</sup> Ladungstransfer kann über größere als die üblichen Entfernungen erfolgen, entweder weil die höheren Anregungsintensitäten, wie sie für Fluoreszenzanregung benötigt werden, zu hochangeregten Ionisierungszuständen führen oder weil die Ladungen durch redoxaktive Spezies wie Sauerstoff weitergeleitet werden.<sup>[104,129]</sup> Blinken liefert Informationen über die Dynamik der Matrix, wie mit Rhodamin 6G in Glycerin festgestellt wurde.<sup>[130]</sup> Eine Ladungsrekombination könnte durch thermisch angeregte molekulare Bewegungen oberhalb der Glasübergangstemperatur sowie durch Tunneln bei tieferen Temperaturen unterstützt werden. Ein besonders wichtiges Thema ist der grenzschichtübergreifende Ladungstransfer zwischen einem angeregten Molekül und einem Halbleiter, sei es in einem Film oder bei Nanopartikeln. Dieses sind gerade die Transferprozesse, die in bestimmten Solarzellen stattfinden. Einzelmoleküluntersuchungen der Transfer- und Rekombinationsraten<sup>[131–133]</sup> zeigen eine ausgedehnte Verteilung dieser Raten, die zu Potenzgesetzen folgenden Kinetiken führen. Dies kann zu einem besseren Verständnis in Solarzellen stattfindender Prozesse und damit letztlich zu deren Kontrolle beitragen.

### 3.6. Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)

Das ideale Hilfsmittel für die optische Analyse weicher und komplexer Materie auf der Nanometerebene könnte eine auf sehr kleine Volumina beschränkbare und für die chemischen Verhältnisse empfindliche Technik wie die Raman-Streuung sein. Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (surface-enhanced raman scattering, SERS) ist aus diesem Grund sehr aussichtsreich. SERS nutzt eine Erhöhung des Raman-Streuquerschnitts bestimmter Moleküle, wenn sie auf Metalloberflächen – häufig Silber – aufgebracht werden, besonders bei rauen oder mikrostrukturierten Oberflächen oder Aggregaten kolloidaler Metallpartikel.<sup>[134,135]</sup> Diese Erhöhung kann mehr als zehn Größenordnungen erreichen, wodurch selbst geringste Mengen einer Verbindung mit einem Raman-Spektrometer detektierbar werden können. Bereits Ende der

1990er Jahre zeigten Mikroskopieexperimente, dass die Empfindlichkeit von SERS die Einzelmoleküldetektionsgrenze erreichen kann.<sup>[136,137]</sup> Die wichtigsten Beobachtungen waren plötzliche spektrale Sprünge der Frequenzen oder Intensitäten der Raman-Linien<sup>[136,138]</sup> sowie hohe Besetzungszahlen kurzlebiger Schwingungszustände, in Einklang mit einer kleinen Zahl hochangeregter Emittoren.<sup>[137]</sup>

Es gibt verschiedene mögliche Ursachen für den großen Verstärkungsfaktor.<sup>[139,140]</sup> Zum einen scheint SERS eine elektronische Wechselwirkung zwischen dem Molekül und dem Metall zu erfordern. Diese partielle elektronische Hybridisierung bewirkt die so genannte chemische Verstärkung, die durch Resonanzeffekte weiter erhöht sein könnte. Zusätzliche Präresonanz zwischen dem Anregungslaser und dem Molekül könnte das Raman-Signal noch weiter vergrößern. Der größte Teil des Effekts scheint aber auf die Konzentration optischer elektrischer Felder durch metallische Strukturen zurückzuführen zu sein, die möglicherweise durch Plasmonenresonanz unterstützt wird. Dieser Effekt, der auch als elektromagnetische Verstärkung bezeichnet wird, kann mithilfe von Simulationen der Maxwell-Gleichungen berechnet werden, die auf Finite-Elemente-Methoden beruhen. Die so erhaltenen Ergebnisse, wie sie in Lit. [140] dargestellt sind, zeigen, wie außerordentlich empfindlich die Verstärkung in Bezug auf die exakte Position des Moleküls relativ zu Spitzen oder Spalten sowie in Bezug auf die exakte Struktur des metallischen Systems sein kann. Dies wird exemplarisch in Abbildung 6 veranschaulicht. Eine Verschiebung um nur wenige Nanometer kann die elektromagnetische Verstärkung um mehrere Größenordnungen verändern. Die chemische Verstärkung, die in Kombination mit der Empfindlichkeit für das elektrische Feld die Stärke des SERS-Signals bestimmt, wird ebenfalls von Details auf molekularer Ebene beeinflusst. Die daraus resultierende starke Abhängigkeit von lokalen Eigenschaften macht die Verwendung von SERS-Signalen schwierig, da die Beiträge der einzelnen Moleküle unter einer

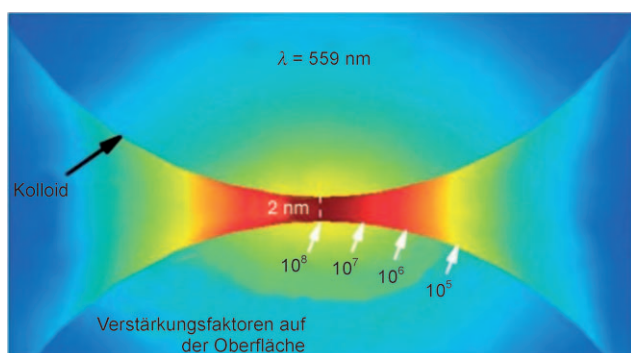
logarithmischen Verteilung versteckt sind. Nach den Zeitverteilungen beim Blinken finden wir somit ein weiteres Beispiel einer sehr breiten Verteilung von Einzelmoleküleigenschaften, die Mittelungen ihre gewöhnliche physikalische Bedeutung verlieren lässt. Ein einziger oder wenige isolierte Beiträge können das Signal völlig dominieren, selbst wenn man eine Ensemblemittelung durchführt.

Angesichts der Schwierigkeiten einer quantitativen Verwendung von Einzelmolekül-SERS-Signalen stellt sich die Frage, wie weit uns SERS einer chemisch empfindlichen Analyse von Materie auf Nanometerebene näher bringen kann. Es ist offensichtlich, dass die elektrischen Wechselwirkungen und die für SERS erforderlichen kleinen Abstände zu drastischen Molekülverzerrungen und unvermeidlicherweise zu Denaturierung (z. B. bei Proteinen) führen. Der Traum von einer universell einsetzbaren Einzelmolekül-Raman-Spektroskopie hat sich deshalb bisher noch nicht erfüllt.

#### 4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Wie wir gesehen haben, werden optische Detektion und Untersuchungen von Einzelmolekülen und einzelnen Nanopartikeln bereits vielfältig für die Erforschung komplexer Materie eingesetzt, und zwar nicht nur bei komplizierten biologischen Materialien, sondern auch bei ungeordneten oder sich verändernden Strukturen, wie man sie in weicher Materie oder kompliziert aufgebauten Materialien findet. In der Regel ist das mittlungsfreie Bild, das sich aus solchen Untersuchungen auf molekularer Ebene ergibt, in räumlicher wie auch zeitlicher Hinsicht erstaunlich heterogen und komplex. Das Konzept eines „mittleren Moleküls“ (oder eines/ einer mittleren Pore, Umwelt, Wertes, Reaktionsgeschwindigkeit usw.) ist weit davon entfernt, ein verlässlicher Leitfaden zu sein, und sollte in den meisten Fällen durch eine differenziertere Beschreibung ersetzt werden.<sup>[141]</sup> Diese neuen Erkenntnisse könnten für viele Bereiche der physikalischen Chemie und der Materialwissenschaften essenziell sein, z. B. in den nachfolgend genannten Fällen.

Die Kontaktfläche zwischen zwei Festkörpern hat eine komplizierte Struktur,<sup>[142]</sup> die für so wichtige Eigenschaften wie Adhäsion und Reibung verantwortlich ist. Nominell glatte Oberflächen berühren einander häufig nur an einigen wenigen Punkten, was zu Spannungen und Deformationen mit ausgesprochen heterogener Charakteristik führt. Da die Rasterkraftmikroskopie Parameter nur für kleinste molekulare Kontaktflächen liefert, besteht dringender Bedarf für komplementäre Untersuchungen der Verteilung dieser Kontaktpunkte bei realem, großflächigem Kontakt zwischen zwei Festkörpern. Diese Informationen könnten unter Verwendung von über die Flächen verteilten Einzelmolekülen zugänglich gemacht werden, deren Reorientierungen oder spektrale Verschiebungen lokale Spannungen und Deformationen sichtbar machen würden. Ebenso könnten auf diese Weise die Wechselwirkung einer Festkörperoberfläche mit einer Flüssigkeit bei Benetzung und Trocknung oder der Einfluss mechanischer Einwirkungen erforscht und damit die weiter oben diskutierten, ersten Studien erweitert werden. Weitere Anwendungen ergeben sich in so vielfältigen Berei-



**Abbildung 6.** Verteilung des elektromagnetischen Verstärkungsfaktors  $F$  an einem 2 nm breiten Spalt zwischen zwei Goldkolloiden mit Radien von 30 nm.  $F$  wurde in elektrostatischer Annäherung mit Finite-Elemente-Modellierung der Polarisation entlang der vertikalen Achse des Dimers berechnet. Die Berechnung erfolgte für eine Wellenlänge von  $\lambda = 559$  nm, bei der  $F$  einen Maximalwert von ca.  $10^8$  an der Oberfläche eines der Kolloide annimmt. Einige Werte für  $F$  entlang der Oberfläche in verschiedenen Abständen von der vertikalen Achse sind angegeben; sie können erheblich auf einer Längenskala vergleichbar einer typischen Molekülgröße variieren. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [140], Copyright 2008 Royal Society of Chemistry.



chen wie der plastischen Deformation von Festkörpern und Polymeren, Brüchen in Festkörpern und Verbundmaterialien und Kontakten zwischen Teilchen in konzentrierten Suspensionen, Pasten und Schlämmen.

Außer den weiter oben diskutierten Glasübergängen führen auch Phasenübergänge erster Ordnung häufig zu starker Heterogenität in der räumlichen Verteilung der Phasen. So entstehen z.B. beim Abkühlen unter die Temperatur des ferro-elastischen Übergangs in *p*-Terphenylkristallen Domänengrenzen. Ihre Verteilung und Dynamik kann bei tiefen Temperaturen mittels hochauflösender Spektroskopie der Null-Photonen-Linien einzelner Sondenmoleküle ermittelt werden.<sup>[143,144]</sup> In letzter Zeit erschienen diverse Beiträge über Untersuchungen zu molekularen Kristallen, z.B. über inkomensurable Phasen von Biphenyl<sup>[145,146]</sup> oder über Unordnung und molekulare Reorientierungen in Dimethylnaphthalin in einem breiten Temperaturbereich.<sup>[147]</sup> Für einen Überblick über die jüngsten Fortschritte in der Physik und Chemie von Festkörpern bei tiefen Temperaturen unter Einschluss dynamischer Aspekte in Kristallen und weniger geordneten Systeme möchten wir auf ein Kapitel eines demnächst erscheinenden Buchs verweisen.<sup>[148]</sup>

Zur Lösung der aufgeführten Probleme wird es notwendig sein, die relevanten und leicht zugänglichen optischen Observablen zu identifizieren, die lokale Bedingungen widerspiegeln. Wie wir in diesem Aufsatz herauszuarbeiten versucht haben, können fast alle Charakteristika eines Fluoreszenzsignals (Polarisation, Spektrum, Lebenszeiten, Positionen usw.) dazu herangezogen werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass Einzelmolekülmethoden ein detailliertes Bild kondensierter Materie liefern, das häufig überraschend große Inhomogenitäten und Abweichungen vom Mittelwert zeigt. Ein immer wieder auftauchendes Thema dieses Aufsatzes sind die breiten Verteilungen bestimmter molekularer Parameter, z.B. von Reaktionsgeschwindigkeiten, was zu einer über einen weiten Zeitbereich gestreckten Proteindynamik und zu Potenzgesetzen beim Blinken oder bei grenzflächenüberspannenden Ladungstransfers führt. Logarithmische Verteilungen der Feldverstärkung bei SERS sind ein weiteres auffallendes Beispiel dieser Regel. Anstatt einfach das Ergebnis einer Mittelwertbildung über eine große Zahl von Molekülen mit weit voneinander abweichenden Eigenschaften zu sein, treten diese breiten Verteilungen schon bei Einzelmolekülen aufgrund von Konformations- und/oder dynamischer Mittelung auf. Stretched kinetics und breite Verteilungen<sup>[149]</sup> scheinen also ein zentraler Bestandteil der chemischen Physik weicher Materialien zu sein.

Die in Lit. [47,49,130] zitierten Arbeiten sind Teil des Forschungsprogramms der „Stichting voor Fundamenteel Onderzoek der Materie“ (FOM) und wurden von der NWO gefördert. F.K. dankt für finanzielle Unterstützung durch das spanische Ministerium für Wissenschaft und Innovation im Rahmen eines Ramón-y-Cajal-Stipendiums.

Eingegangen am 31. August 2009  
Online veröffentlicht am 5. Januar 2010

- [1] P. W. Anderson, *Science* **1972**, 177, 393–396.
- [2] W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* **1999**, 283, 1670–1676.
- [3] G. Binning, H. Rohrer, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1982**, 49, 57–61.
- [4] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930–933.
- [5] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 62, 2535–2538.
- [6] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, 65, 2716–2719.
- [7] E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **1993**, 262, 1422–1425.
- [8] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, 72, 160–163.
- [9] J. K. Trautman, J. J. Macklin, L. E. Brus, E. Betzig, *Nature* **1994**, 369, 40–42.
- [10] X. S. Xie, R. C. Dunn, *Science* **1994**, 265, 361–364.
- [11] J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, *Science* **1996**, 272, 255–258.
- [12] J. K. Trautman, J. J. Macklin, *Chem. Phys.* **1996**, 205, 221–229.
- [13] X. S. Xie, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 598–606.
- [14] H. P. Lu, X. S. Xie, *Nature* **1997**, 385, 143–146.
- [15] W. E. Moerner, D. P. Fromm, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, 74, 3597–3619.
- [16] M. Böhmer, J. Enderlein, *ChemPhysChem* **2003**, 4, 792–808.
- [17] F. Kulzer, M. Orrit, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, 55, 585–611.
- [18] P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2698–2728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2642–2671.
- [19] W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 12596–12602.
- [20] S. W. Hell, *Science* **2007**, 316, 1153–1158.
- [21] R. C. Somers, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 579–591.
- [22] Übersicht: M. A. Van Dijk, M. Lippitz, M. Orrit, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 594–601.
- [23] Y. H. Liao, A. N. Unterreiner, Q. Chang, N. F. Scherer, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 2135–2142.
- [24] M. Lippitz, M. A. van Dijk, M. Orrit, *Nano Lett.* **2005**, 5, 799–802.
- [25] H. F. Wang, T. B. Huff, D. A. Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei, J. X. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15752–15756.
- [26] Übersicht: M. A. van Dijk, A. L. Tchegbotareva, M. Orrit, M. Lippitz, S. Berciaud, D. Lasne, L. Cognet, B. Lounis, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 3486–3495.
- [27] C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, *New J. Phys.* **2002**, 4, 93.
- [28] P. Kukura, M. Celebrano, A. Renn, V. Sandoghdar, *Nano Lett.* **2009**, 9, 926–929.
- [29] D. Boyer, P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, *Science* **2002**, 297, 1160–1163.
- [30] S. Berciaud, L. Cognet, G. A. Blab, B. Lounis, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 93, 257402.
- [31] L. Cognet, S. Berciaud, D. Lasne, B. Lounis, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2288–2294.
- [32] D. Lasne, G. A. Blab, S. Berciaud, M. Heine, L. Groc, D. Choquet, L. Cognet, B. Lounis, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4598–4604.
- [33] S. Berciaud, L. Cognet, P. Poulin, R. B. Weisman, B. Lounis, *Nano Lett.* **2007**, 7, 1203–1207.
- [34] F. Kulzer, N. Laurens, J. Besser, T. Schmidt, M. Orrit, H. P. Spaink, *ChemPhysChem* **2008**, 9, 1761–1766.
- [35] V. Octeau, L. Cognet, L. Duchesne, D. Lasne, N. Schaeffer, D. G. Fernig, B. Lounis, *ACS Nano* **2009**, 3, 345–350.
- [36] R. Radünz, D. Rings, K. Kroy, F. Cichos, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 1674–1677.
- [37] P. M. R. Paulo, A. Gaiduk, F. Kulzer, S. F. G. Krens, T. Schmidt, M. Orrit, H. P. Spaink, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 11451–11457.

- [38] C. A. Werley, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18939–18944.
- [39] A. A. L. Nicolet, P. Bordat, C. Hofmann, M. A. Kol'chenko, B. Kozankiewicz, R. Brown, M. Orrit, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 1929–1936.
- [40] A. Bloess, Y. Durand, M. Matsushita, J. Schmidt, E. J. J. Groenen, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 55–60.
- [41] M. Matsushita, A. Bloess, Y. Durand, J. Y. P. Butter, J. Schmidt, E. J. J. Groenen, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 3383–3390.
- [42] K. L. Wustholz, B. Kahr, P. J. Reid, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16357–16362.
- [43] R. A. L. Vallée, M. Van Der Auweraer, F. C. De Schryver, D. Beljonne, M. Orrit, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 81–91.
- [44] R. A. L. Vallée, N. Tomczak, G. J. Vancso, L. Kuipers, N. F. van Hulst, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 114704.
- [45] P. Bordat, M. Orrit, R. Brown, A. Würger, *Chem. Phys.* **2000**, *258*, 63–72.
- [46] K. Schröter, E. Donth, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 9101–9108.
- [47] R. Zondervan, F. Kulzer, G. C. G. Berkhout, M. Orrit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12628–12633.
- [48] L. A. Deschenes, D. A. Vanden Bout, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11438–11445.
- [49] R. Zondervan, T. Xia, H. van der Meer, C. Storm, F. Kulzer, W. van Saarloos, M. Orrit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4993–4998.
- [50] S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32.
- [51] D. Wöll, E. Braeken, A. Deres, F. C. De Schryver, H. Uji-i, J. Hofkens, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 313–328.
- [52] T. Basché, W. P. Ambrose, W. E. Moerner, *J. Opt. Soc. Am. B* **1992**, *9*, 829–836.
- [53] M. A. Bopp, A. J. Meixner, G. Tarrach, I. Zschokke-Gränacher, L. Novotny, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *263*, 721–726.
- [54] R. A. L. Vallée, W. Paul, K. Binder, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 154903.
- [55] *Amorphous solids: low-temperature properties*, Vol. 24 (Hrsg.: W. A. Phillips), Springer, Berlin, **1981** (Topics in current physics).
- [56] A. Zumbusch, L. Fleury, R. Brown, J. Bernard, M. Orrit, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *70*, 3584–3587.
- [57] A. M. Boiron, P. Tamarat, B. Lounis, R. Brown, M. Orrit, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 119–132.
- [58] F. Stracke, C. Blum, S. Becker, K. Müllen, A. J. Meixner, *Chem. Phys.* **2004**, *300*, 153–164.
- [59] A. C. Wirtz, M. Dokter, C. Hofmann, E. J. J. Groenen, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *417*, 383–388.
- [60] A. C. Wirtz, C. Hofmann, E. J. J. Groenen, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 21623–21629.
- [61] W. Trabesinger, A. Renn, B. Hecht, U. P. Wild, A. Montali, P. Smith, C. Weder, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5221–5224.
- [62] W. Trabesinger, A. Renn, B. Hecht, U. P. Wild, A. Montali, P. Smith, C. Weder, *Synth. Met.* **2001**, *124*, 113–115.
- [63] J. Y. P. Butter, B. R. Crenshaw, C. Weder, B. Hecht, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 261–265.
- [64] R. A. L. Vallée, M. Cotlett, M. Van der Auweraer, J. Hofkens, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2296–2297.
- [65] L. A. Deschenes, D. A. Vanden Bout, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 5850–5856.
- [66] A. Schob, F. Cichos, J. Schuster, C. von Borczyskowski, *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 1019–1026.
- [67] H. Uji-i, S. M. Melnikov, A. Deres, G. Bergamini, F. De Schryver, A. Herrmann, K. Müllen, J. Enderlein, J. Hofkens, *Polymer* **2006**, *47*, 2511–2518.
- [68] a) M. D. Ediger, *J. Non-Cryst. Solids* **1998**, *235*, 10–18; b) M. T. Cicerone, M. D. Ediger, *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 7210–7218.
- [69] T. T. Perkins, D. E. Smith, S. Chu, *Science* **1994**, *264*, 819–822.
- [70] A. E. Cohen, W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12622–12627.
- [71] Übersicht: P. F. Barbara, A. J. Gesquiere, S. J. Park, Y. J. Lee, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 602–610.
- [72] H. Zettl, U. Zettl, G. Krausch, J. Enderlein, M. Ballauff, *Phys. Rev. E* **2007**, *75*, 061804.
- [73] P. A. J. de Witte, J. Hernando, E. E. Neuteboom, E. M. H. P. van Dijk, S. C. J. Meskers, R. A. J. Janssen, N. F. van Hulst, R. J. M. Nolte, M. F. García-Parajó, A. E. Rowan, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7803–7812.
- [74] M. Hinczewski, X. Schlagberger, M. Rubinstein, O. Krichesky, R. R. Netz, *Macromolecules* **2009**, *42*, 860–875.
- [75] H. Yang, G. B. Luo, P. Karnchanaphanurach, T. M. Louie, I. Rech, S. Cova, L. Y. Xun, X. S. Xie, *Science* **2003**, *302*, 262–266.
- [76] K. Velonia, O. Flomenbom, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A. E. Rowan, J. Klafter, R. J. M. Nolte, F. C. de Schryver, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 566–570; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 560–564.
- [77] B. Schuler, W. A. Eaton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 16–26.
- [78] H. M. Chen, E. Rhoades, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 516–524.
- [79] H. Frauenfelder, B. H. McMahon, *Ann. Phys.* **2000**, *9*, 655–667.
- [80] O. Flomenbom, K. Velonia, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, M. Van der Auweraer, F. C. de Schryver, J. Klafter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2368–2372.
- [81] J. Schuster, F. Cichos, C. von Borczyskowski, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 5403–5406.
- [82] J. Schuster, F. Cichos, C. von Borczyskowski, *Eur. Phys. J. E* **2003**, *12*, 75–80.
- [83] J. Schuster, F. Cichos, C. von Borczyskowski, *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 993–999.
- [84] A. Schob, F. Cichos, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 4354–4358.
- [85] F. M. Ye, M. M. Collinson, D. A. Higgins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 66–82.
- [86] C. Hellriegel, J. Kirstein, C. Bräuchle, V. Latour, T. Pigot, R. Olivier, S. Lacombe, R. Brown, V. Guieu, C. Payraastre, A. Izquierdo, P. Mocho, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 14699–14709.
- [87] C. Hellriegel, J. Kirstein, C. Bräuchle, *New J. Phys.* **2005**, *7*, 23.
- [88] J. Kirstein, B. Platschek, C. Jung, R. Brown, T. Bein, C. Bräuchle, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 303–310.
- [89] C. Jung, C. Hellriegel, J. Michaelis, C. Bräuchle, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 956–960.
- [90] C. Jung, C. Hellriegel, B. Platschek, D. Wöhrle, T. Bein, J. Michaelis, C. Bräuchle, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5570–5579.
- [91] A. Zürner, J. Kirstein, M. Döblinger, C. Bräuchle, T. Bein, *Nature* **2007**, *450*, 705–708.
- [92] C. Jung, J. Kirstein, B. Platschek, T. Bein, M. Budde, I. Frank, K. Müllen, J. Michaelis, C. Bräuchle, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1638–1648.
- [93] D. A. Higgins, M. M. Collinson, G. Saroja, A. M. Bardo, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3734–3744.
- [94] S. Brasselet, W. E. Moerner, *Single Mol.* **2000**, *1*, 17–23.
- [95] S. J. Lord, N. R. Conley, H. L. D. Lee, S. Y. Nishimura, A. K. Pomerantz, K. A. Willets, Z. K. Lu, H. Wang, N. Liu, R. Samuel, R. Weber, A. Semyonov, M. He, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 55–65.
- [96] C. Jung, N. Ruthardt, R. Lewis, J. Michaelis, B. Sodeik, F. Nolde, K. Peneva, K. Müllen, C. Bräuchle, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 180–190.
- [97] J. Bernard, L. Fleury, H. Talon, M. Orrit, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 850–859.
- [98] J. Hofkens, M. Maus, T. Gensch, T. Vosch, M. Cotlet, F. Köhn, A. Herrmann, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9278–9288.

- [99] F. Köhn, J. Hofkens, R. Gronheid, M. Van der Auweraer, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 4808–4814.
- [100] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 3117–3120.
- [101] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 1028–1040.
- [102] P. H. Sher, J. M. Smith, P. A. Dalgarno, R. J. Warburton, X. Chen, P. J. Dobson, S. M. Daniels, N. L. Pickett, P. O'Brien, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *92*, 101111.
- [103] K. T. Shimizu, R. G. Neuhauser, C. A. Leatherdale, S. A. Empedocles, W. K. Woo, M. G. Bawendi, *Phys. Rev. B* **2001**, *63*, 205316.
- [104] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 6770–6776.
- [105] M. Haase, C. G. Hübner, E. Reuther, A. Herrmann, K. Müllen, T. Basché, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10445–10450.
- [106] J. P. Hoogenboom, E. M. H. P. van Dijk, J. Hernando, N. F. van Hulst, M. F. García-Parajó, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 097401.
- [107] 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.
- [108] J. N. Clifford, T. D. M. Bell, P. Tinnefeld, M. Heilemann, S. M. Melnikov, J. Hotta, M. Sliwa, P. Dedecker, M. Sauer, J. Hofkens, E. K. L. Yeow, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 6987–6991.
- [109] M. Kuno, D. P. Fromm, S. T. Johnson, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, *Phys. Rev. B* **2003**, *67*, 125304.
- [110] F. Cichos, C. von Borczyskowski, M. Orrit, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 272–284.
- [111] F. D. Stefani, J. P. Hoogenboom, E. Barkai, *Phys. Today* **2009**, *62*, 34–39.
- [112] K. L. Wustholz, E. D. Bott, C. M. Isborn, X. S. Li, B. Kahr, P. J. Reid, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 9146–9156.
- [113] K. L. Wustholz, E. D. Bott, B. Kahr, P. J. Reid, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 7877–7885.
- [114] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 1–16.
- [115] F. Jelezko, J. Wrachtrup, *Phys. Status Solidi A* **2006**, *203*, 3207–3225.
- [116] D. Gammon, D. G. Steel, *Phys. Today* **2002**, *55*, 36–41.
- [117] P. Michler, *Top. Appl. Phys.* **2003**, *90*, 315–347.
- [118] Y. Chen, J. Vela, H. Htoon, J. L. Casson, D. J. Werder, D. A. Bussian, V. I. Klimov, J. A. Hollingsworth, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5026.
- [119] P. Spinicelli, B. Mahler, S. Buil, X. Quelin, B. Dubertret, J. P. Hermier, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 879–882.
- [120] X. Wang, X. Ren, K. Kahen, M. A. Hahn, M. Rajeswaran, S. Maccagnano-Zacher, J. Silcox, G. E. Cragg, A. L. Efros, T. D. Krauss, *Nature* **2009**, *459*, 686–689.
- [121] A. Issac, C. von Borczyskowski, F. Cichos, *Phys. Rev. B* **2005**, *71*, 161302.
- [122] J. Schuster, F. Cichos, C. von Borczyskowski, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*, 051915.
- [123] S. Hohng, T. Ha, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1324–1325.
- [124] J. Schuster, F. Cichos, C. von Borczyskowski, *Opt. Spectrosc.* **2005**, *98*, 712–717.
- [125] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5545–5550; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5465–5469.
- [126] M. Bates, T. R. Blosser, X. W. Zhuang, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 108101.
- [127] 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.
- [128] M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [129] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol'chenko, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 1657–1665.
- [130] R. Zondervan, F. Kulzer, H. van der Meer, J. A. J. M. Disselhorst, M. Orrit, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2958–2969.
- [131] Y. M. Wang, X. F. Wang, S. K. Ghosh, H. P. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1479–1487.
- [132] Y. M. Wang, X. F. Wang, H. P. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9020–9025.
- [133] V. Biju, M. Micic, D. H. Hu, H. P. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9374–9381.
- [134] A. Otto, *Light Scattering in Solids IV—Electronic scattering, spin effects, SERS, and morphic effects*, Vol. 54, Springer, Berlin, **1984**, S. 289 (Topics in Applied Physics).
- [135] N. P. W. Pieczonka, R. F. Aroca, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 946–954.
- [136] S. M. Nie, S. R. Emery, *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- [137] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, M. S. Feld, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 1667–1670.
- [138] H. X. Xu, E. J. Bjerneld, M. Kall, L. Borjesson, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 4357–4360.
- [139] T. Vosgröne, A. J. Meixner, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 154–163.
- [140] Übersicht: P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6079–6089.
- [141] E. Barkai, Y. J. Jung, R. Silbey, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 457–507.
- [142] C. Yang, B. N. J. Persson, *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, *20*, 215214.
- [143] P. D. Reilly, J. L. Skinner, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 4257–4260.
- [144] P. D. Reilly, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 1540–1552.
- [145] M. Pars, V. Palm, A. Kuznetsov, J. Kikas, *J. Lumin.* **2007**, *122*, 241–243.
- [146] V. Palm, M. Pars, J. Kikas, M. Nilsson, S. Kroll, *J. Lumin.* **2007**, *127*, 218–223.
- [147] M. Banasiewicz, D. Wiacek, B. Kozankiewicz, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *425*, 94–98.
- [148] M. Orrit, W. E. Moerner in *Physics and chemistry at low temperature* (Hrsg.: L. Khriachtchev), World Scientific, Singapore, **2009**, im Druck.
- [149] R. Hilfer, R. Metzler, A. Blumen, J. Klafter, *Chem. Phys.* **2002**, *284*, 1–2.