

4. Fluoreszenzspektroskopie

4.1 Allgemeine Versuchsbedingungen und Fluoreszenzspektren des Octacarbonsäureporphyrins (32)

Die als Träger verwendeten Goldelektroden wurden durch Goldbedampfung von mit Chrom beschichteten Glaträgern hergestellt^{76,77}. Die Elektroden wurden mit Chloroform gewaschen, getrocknet und anschließend 30s in eine Lösung von Wasserstoffperoxid/ konz. Schwefelsäure (1:3) getaucht. Die Untersuchung der so behandelten Elektroden erfolgte mit der Raster-Kraft-Mikroskopie (Abb.1).

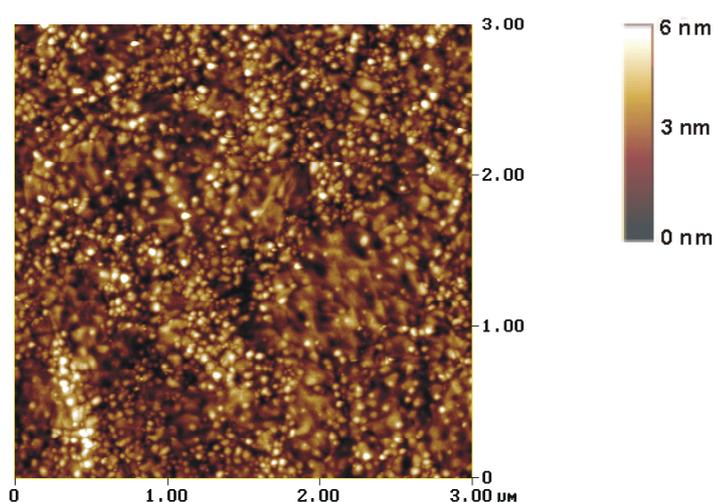


Abb.1:
Rasterkraftfeldmikroskopische
Aufnahme (Tapping Mode) einer
Goldelektrode

Hier wurde eine Rauigkeit der Goldoberfläche von 15 nm ermittelt. Diese hohe Rauigkeit war die Voraussetzung für den Luminescence-Enhancement-Effekt (siehe Charakterisierungsmethoden s.S.41). Nur durch die Verstärkung, die mit diesem Effekt erzielt wurde, war es möglich die Fluoreszenz der aufgelagerten Porphyrine zu messen. Auf vollkommen glatten Goldoberflächen, wie sie durch Goldbedampfung einer Glimmeroberfläche und anschließendes Entfernen der Glimmerschicht erhalten werden ("Glimmer-Gold"), konnte keine Fluoreszenz gemessen werden⁵⁶. Die hohe Rauigkeit war also notwendig, um die Fluoreszenzlöschung durch Energietransfer nach Förster, mit dem Luminescence-Enhancement-Effekt zu kompensieren.

Die Elektroden wurden nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid/ konz. Schwefelsäure und spülen mit dest. Wasser 3 Tage in eine 10^{-3} molare wäßrige Lösung des Octacarbonsäureporphyrins **32** (pH=12) getaucht, die überschüssigen Porphyrine wurden durch Waschen mit einer wäßrigen KOH (pH=12) entfernt und die Elektroden im Vakuum getrocknet.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Argon-Laser bei 514 nm (grünes Licht). Im Fluoreszenzspektrum des Octacarbonsäureporphyrins **32** (Abb.2) sind zwei Banden bei 673 nm Q(0,0) und bei 738 nm Q(0,1) zu erkennen.

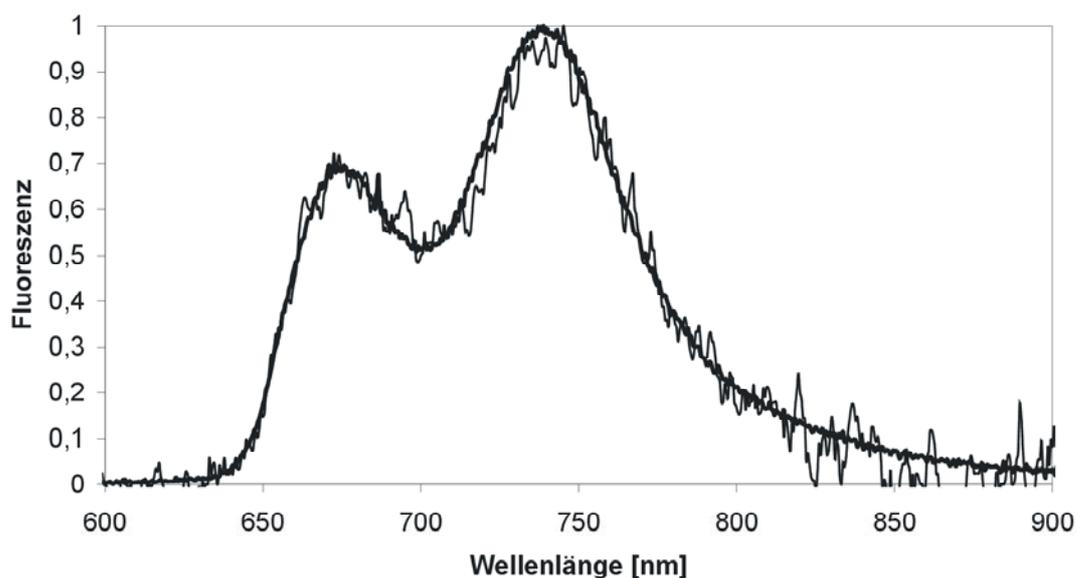


Abb.2: Octacarbonsäureporphyrin **32** auf einer Goldelektrode

Die mit den Porphyrinen bedeckten Elektroden wurden über Nacht in eine 10^{-2} molare Chloroformlösung des Michael-Bolaamphiphils **8** getaucht und mit viel Chloroform gewaschen. Anschließend wurden die Elektroden im Stickstoffstrahl getrocknet, mit milliQ Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Das Fluoreszenzspektrum mit dem "Zaun" aus dem Michael-Bolaamphiphil **8** (Abb.3) zeigt eine Inversion der Bandenintensitäten im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum ohne "Zaun". Hinzu kommt eine Verschiebung der Maxima von 673 nm auf 652 nm und von 738 nm auf 718 nm. Die durch den "Zaun" verursachte Rotverschiebung kann durch eine Veränderung der lokalen Umgebung der eingebetteten Porphyrine hervorgerufen werden.

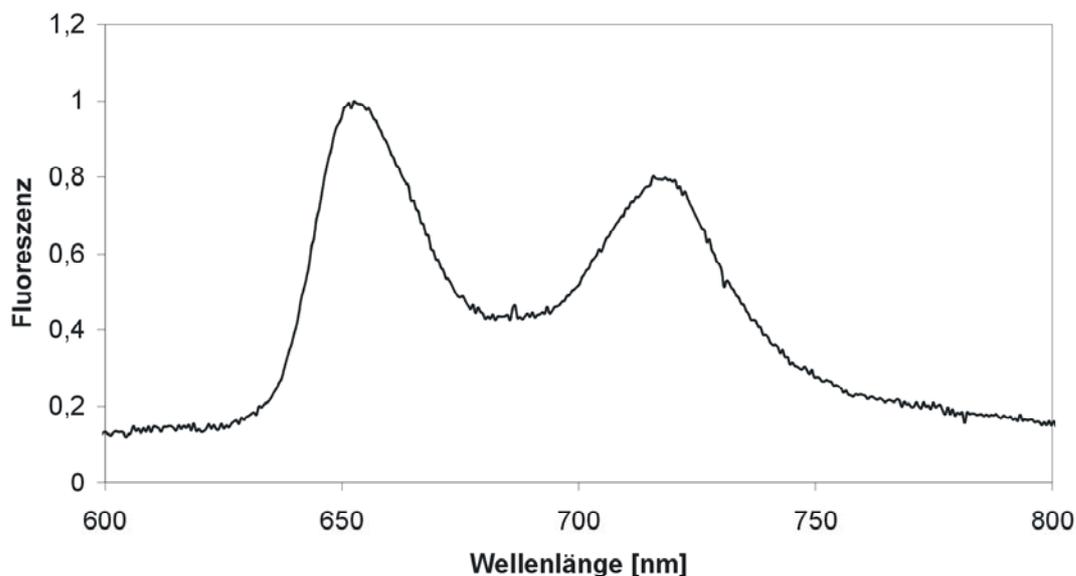


Abb.3: Octacarbonsäureporphyrin **32** und Michael-Bolaamphiphils **8** ("Zaun") auf einer Goldelektrode

Die so behandelten Elektroden wurden erneut mit dem Raster-Kraft-Mikroskop vermessen (Abb.4). Das Ergebnis entsprach dem der Goldelektrode ohne Membranschicht (Abb.1). Durch die notwendige hohe Rauigkeit der Elektroden konnten keine Lücken auf der Oberfläche erkannt werden. Bei der geringen lateralen Auflösung des Raster-Kraft-Mikroskops wäre dies aber auch auf glatten Oberflächen nicht möglich gewesen. Hierzu müßte die Raster-Tunnel-Mikroskopie angewendet werden, die aber nur bei organischen Schichten bis zu einer Dicke von 10-15 Å verwendet werden kann, da andernfalls kein Tunnelstrom mehr fließt^{78,79}. Das Bolaamphiphil **8** (auch **17**) war aber mit einer gebildeten Membranbreite von 20 Å für diese Methode zu lang.

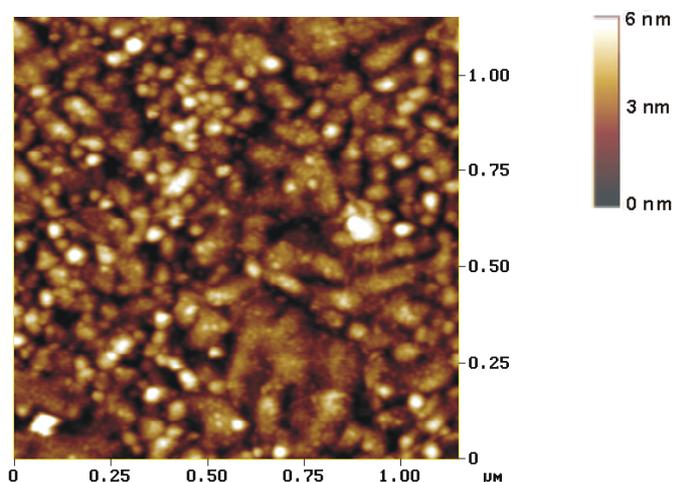


Abb.4: Rasterkraftfeldmikroskopische Aufnahme (Tapping Mode) einer mit Porphyrin **32** und Bola **8** bedeckten Goldelektrode

4.2 Fluoreszenzlöschungsexperimente ohne und mit "Zaun"

Die Fluoreszenz des Octacarbonsäureporphyrins **32** kann durch die Zugabe des Kupferpyridiniumporphyrins **34** (Fluoreszenzlöcher) gelöscht werden. Die tetrakationischen Kupfer-pyridiniumporphyrine **34** bildet mit den anionischen Octacarbonsäureporphyrinen **32** durch Ionenpaarbindung Heterodimere aus, wodurch der Fluoreszenzlöcher nah genug an das Octacarbonsäureporphyrin **32** kommt, um dessen Fluoreszenz zu löschen. Die Fluoreszenzlöschung erfolgt über einen Redox-Mechanismus⁸⁰. Das fluoreszierende Molekül **32** wird durch die eingestrahlte Energie in einen angeregten Singulettzustand versetzt, das angeregte Elektron wird auf den Fluoreszenzlöcher übertragen und kehrt dann in das Ursprungs-Orbital ohne Fluoreszenzstrahlung abzugeben zurück. In unseren Fall wurde das Elektron auf das Kupfer(II)-ion des Pyridiniumporphyrins **34** übertragen.

Die Fluoreszenzlöschungsversuche wurden in Lösung durchgeführt. Eine mit dem Octacarbonsäureporphyrin **32** besetzte Goldelektrode wurde hierzu in eine Fluoreszenzküvette mit wässriger Kaliumhydroxidlösung (pH=12) getaucht. Das Lösungsmittel wurde solange ausgewechselt, bis die Lösung ohne Elektrode keine Fluoreszenz mehr aufwies (fünfmaliger Austausch der Lösung). Durch das Waschen wurden die oberflächlich gebundenen Porphyrine entfernt. Zurück blieben die in den Lücken der Goldelektrode eingebetteten Porphyrine, die auch durch häufiges Waschen nicht zu entfernen waren. Nachdem die Lösung nicht mehr fluoreszierte, wurden 100 µl einer 10⁻⁴ molaren Lösung des Kupfer-pyridiniumporphyrins **34** ohne äußere Durchmischung zugesetzt. Die Konzentration des Fluoreszenzlöschers Kupfer-pyridiniumporphyrins **34** betrug nach der Zugabe 10⁻⁶ M. Innerhalb von 3 Sekunden nach der Zugabe der Löschersubstanz (quencher) ging die Fluoreszenzintensität der auf der Goldelektrode fixierten Porphyrine auf die Hälfte zurück (Abb.5.1 und 5.2).

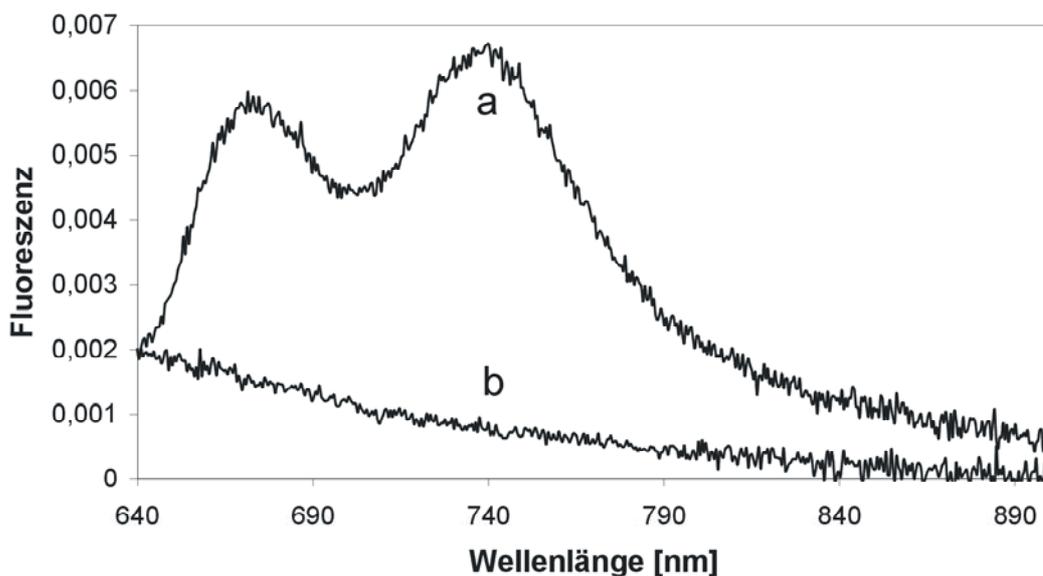


Abb.5.1: Fluoreszenzspektrum des Octacarbonsäureporphyrins **32** auf einer Goldelektrode; a) vor und b) 10 Sekunden nach Zugabe des Kupfer-pyridiniumporphyrins **34**

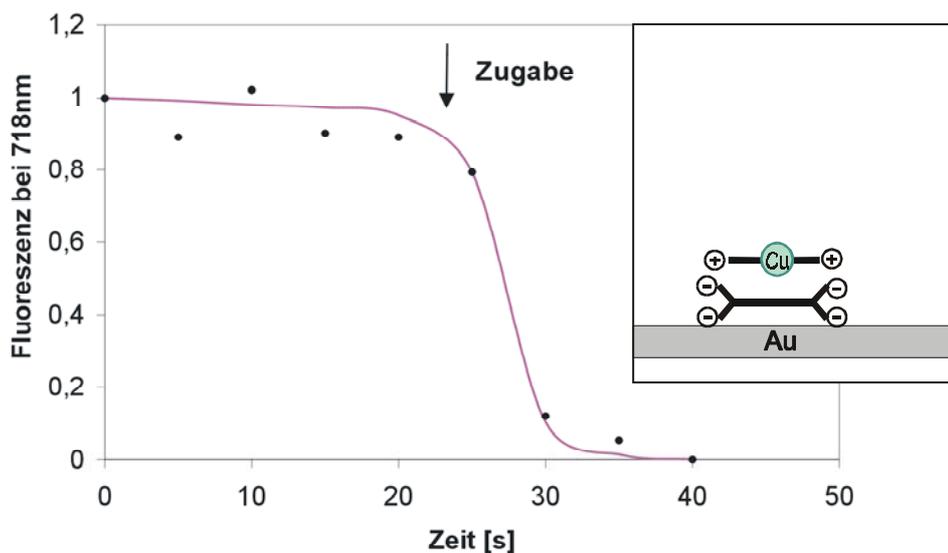


Abb.5.2: Fluoreszenz-Zeitverlauf des Octacarbonsäureporphyrins **32** nach Zugabe des Kupfer-pyridiniumporphyrins **34** und Darstellung des Schemas der Heterodimerisation

Der gleiche Versuch wurde mit einer Goldelektrode mit "Zaun" aus dem Michael-Bolaamphiphil **8** durchgeführt (Abb.6.1 u. 6.2). Hier war erst 60 Sekunden nach Zugabe des Kupfer-pyridiniumporphyrins **34** die Fluoreszenzintensität um die Hälfte abgesunken (ohne "Zaun" innerhalb von 3 Sekunden). Die Ursache für den vergleichsweise langsamen Abfall der Intensität liegt vermutlich in einem zeitverzögernden Such- und Finde-Prozess. Das

Kupfer-pyridiniumporphyrin **34** diffundiert zuerst entlang der Membranoberfläche. Sobald die Lückenöffnung erreicht ist, müssen die in der Lücke enthaltenen Wassermoleküle von dem eindringenden Gastmolekül verdrängt werden, wobei sich vermutlich die Diffusion mit steigender Tiefe der Lücke noch zusätzlich erschwert. Die Wahrscheinlichkeit der Rückdiffusion des Gastmoleküls ins Volumenwasser ist viel größer, als das Eindringen in die Lücke. Von Fudickar et al.²⁴ sind Versuche mit einem vergleichbaren Bolaamphiphil durchgeführt worden (siehe Einleitung). Hier verzögerte sich die Fluoreszenzlöschung noch stärker, erst 30 Minuten nach der Zugabe des Fluoreszenzlöschers war die Fluoreszenzintensität um die Hälfte abgesunken.

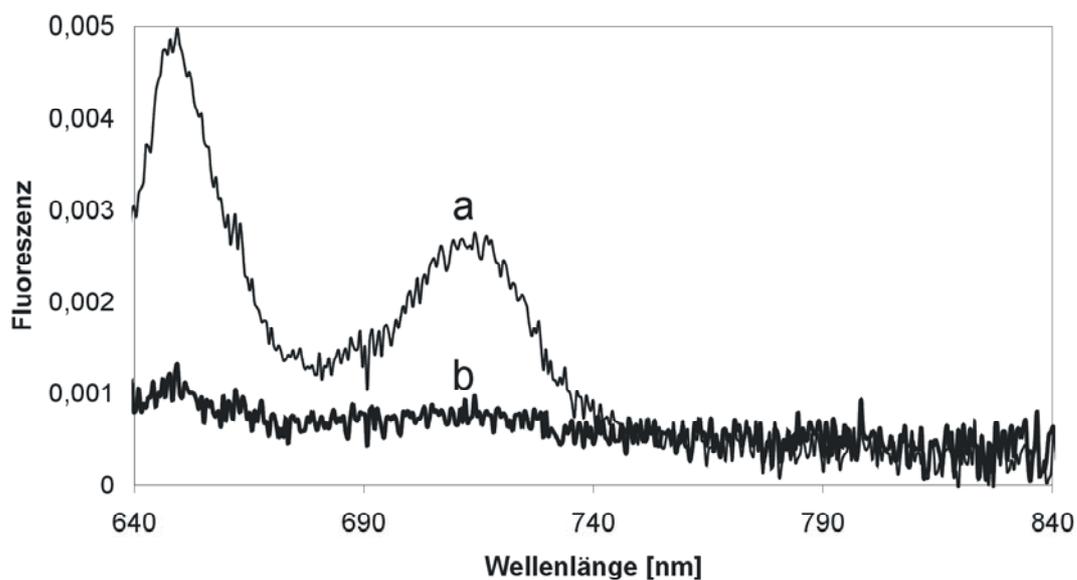


Abb.6.1: Octacarbonsäureporphyrin **32** und "Zaun" aus Michael-Bola **8** auf einer Goldelektrode; a) vor, b) nach der Zugabe des Fluoreszenzlöschers **34**

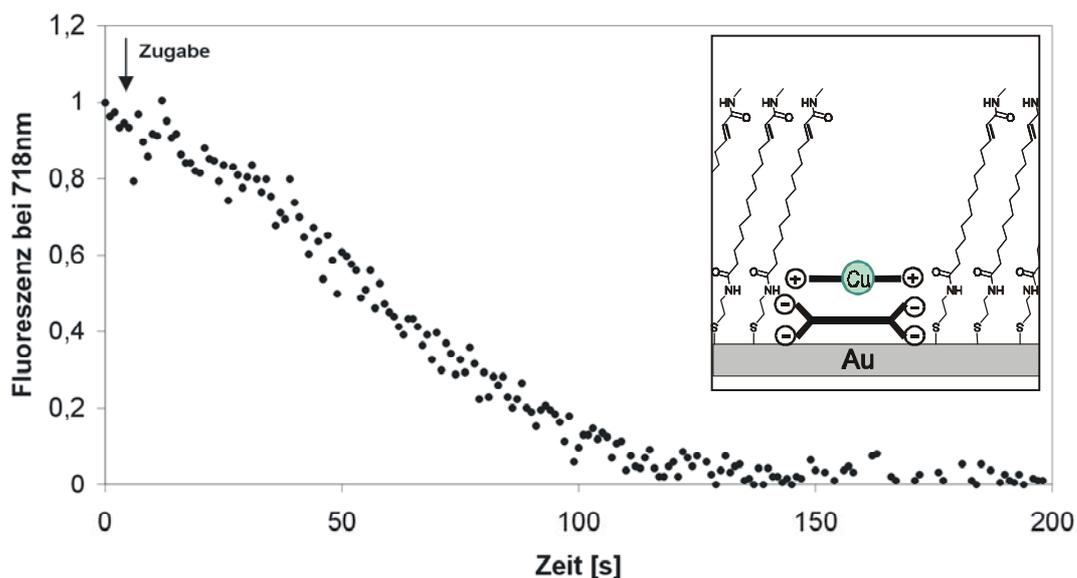


Abb.6.2: Fluoreszenz-Zeitverlauf nach Zugabe des Fluoreszenzlöschers **34** und Schema des entstandenen Heterodimers aus den Porphyrinen **32** und **34**

4.3 Blockieren der Lücken durch *trans*-1,2-Cyclohexandiol

Die mit dem Octacarbonsäureporphyrin **32** und dem "Zaun" aus dem Michael-Bolaamphiphil **8** behandelten Elektroden wurden 1 Stunde in eine 0.5 molare wässrige Lösung von *trans*-1,2-Cyclohexandiol getaucht und anschließend mit milliQ Wasser gewaschen. Bei den nachfolgenden Fluoreszenzmessungen zeigte die Zugabe des Fluoreszenzlöschers **34** keine Wirkung (Abb.7.1 u. 7.2). Im Spektrum ist keine Verminderung der Fluoreszenzintensität zu erkennen und der Fluoreszenz-Zeitverlauf bei 718 nm zeigt ebenfalls keinen Abfall der Intensität. Die Porphyrinlücken wurden folglich durch das *trans*-1,2-Cyclohexandiol blockiert. Das Kupfer-pyridiniumporphyrin **34** konnte nicht mehr eindringen. Auch nach 30 Minuten war keine Verringerung der Fluoreszenzintensität zu erkennen, das eingelagerte *trans*-1,2-Cyclohexandiol diffundierte also nicht in die angrenzende wässrige Phase³⁶.

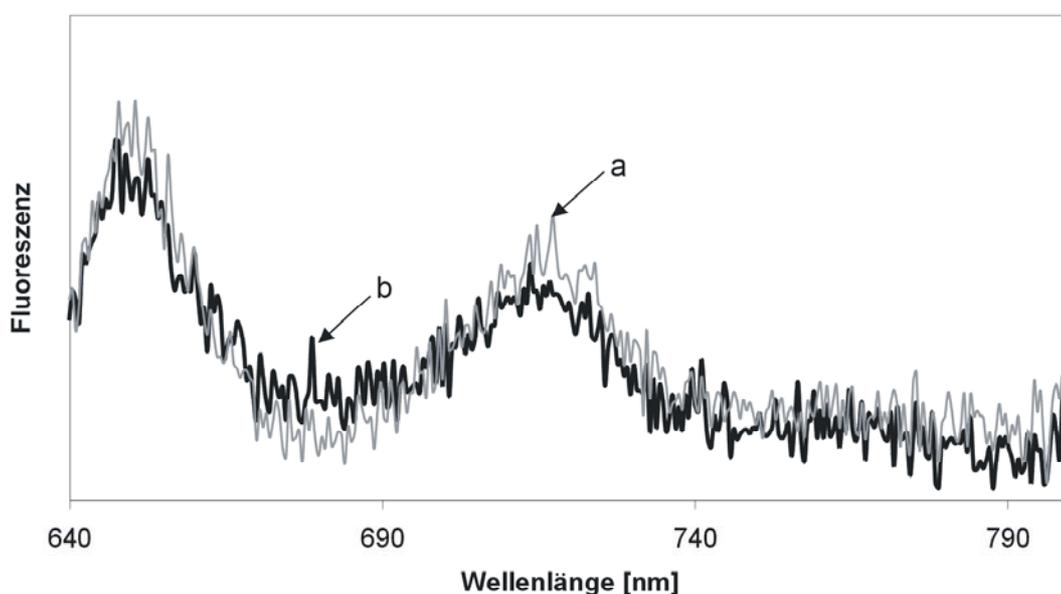


Abb.7.1: Octacarbonsäureporphyrin **32** und "Zaun" aus Michael-Bola **8** auf einer Goldelektrode; a) vor, b) nach der Zugabe des Kupfer-pyridiniumporphyrins **34**

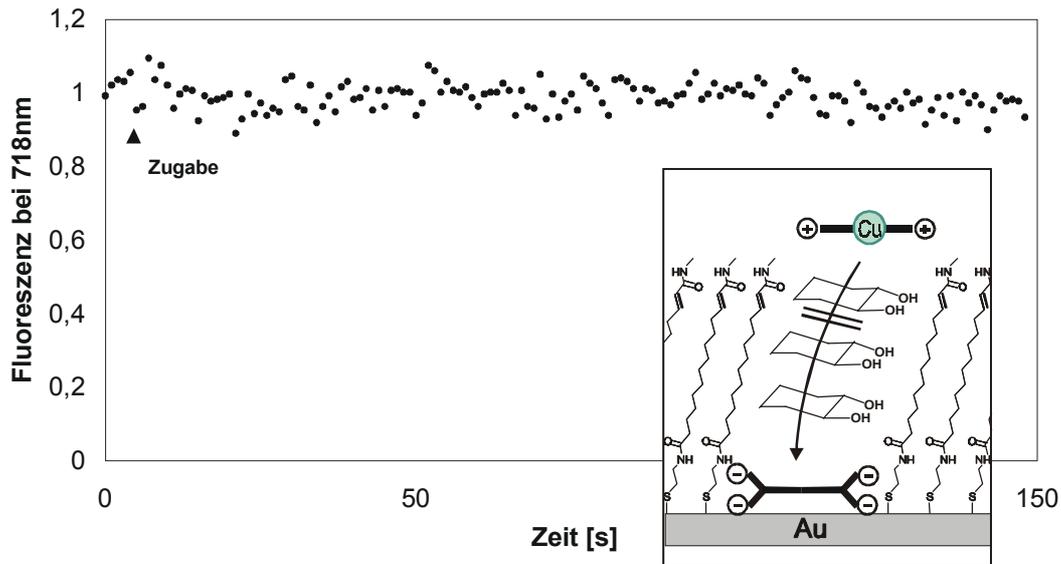


Abb.7.2: Fluoreszenz-Zeitverlauf nach Zugabe des Fluoreszenzlöschers **34** und Schema der Blockade durch *trans*-1,2-Cyclohexandiol

4.4 Einfluß der Methylamin-Michaeladdition

Die mit dem Octacarbonsäureporphyrin **32** und dem Michael-Bolaamphiphil **8** besetzten Goldelektroden wurden über Nacht in eine 0.5 molare wäßrige Methylaminlösung getaucht und mit milliQ Wasser gewaschen. Das Fluoreszenzspektrum zeigte im Anschluß an die Michel-Addition kaum eine Veränderung. Die Bandenintensität, wie auch die Bandenlage sind annähernd unverändert (Abb.8).

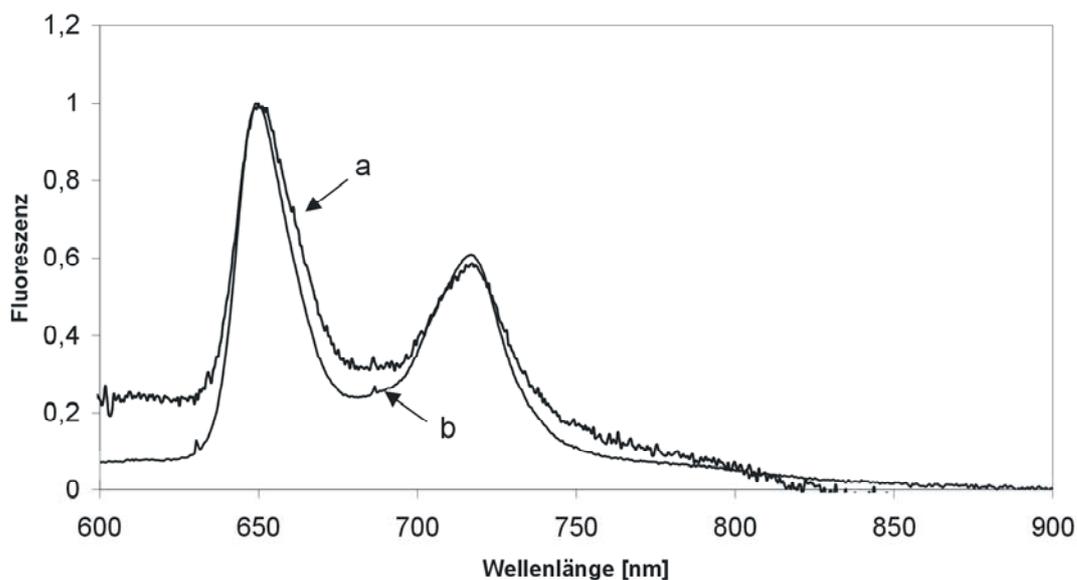


Abb.8: Octacarbonsäureporphyrin **32** und "Zaun" aus Michael-Bola **8** auf einer Goldelektrode; a) vor, b) nach der Michael-Addition durch Methylamin (gleiche Probe)

Die mit Methylamin funktionalisierte Goldelektrode wurde in eine Fluoreszenzküvette gestellt, die anschließend mit wässriger Natronlauge (pH 12) aufgefüllt worden ist. Die Base entfernte die oberflächlich auf der Elektrode abgelagerten Porphyrine. Nach Entfernen der Goldelektrode aus der Küvette zeigte die verbleibende Lösung durch die abgewaschenen und gelösten Porphyrine Fluoreszenz.

Die Natronlauge wurde solange ersetzt, bis keine Porphyrine mehr von der Goldelektrode abgewaschen wurden und die Lösung nicht mehr fluoreszierte. Meist reichte ein fünfmaliger Austausch der Lösung aus. Die Fluoreszenzstrahlung der Elektrode mit Lösung erfolgte nach fünfmaligem Wechsel der Lösung ausschließlich durch die in Membranlücken eingelagerten Porphyrine, die auch durch weiteres Waschen der Elektrode nicht zu entfernen waren.

Die Messung der Fluoreszenzlöschung erfolgte bei neutralem pH-Wert. Die Natronlauge wurde gegen dest. Wasser ausgetauscht und das Kupfer-pyridiniumporphyrin **34** hinzugefügt (Abb.9.1 u. 9.2).

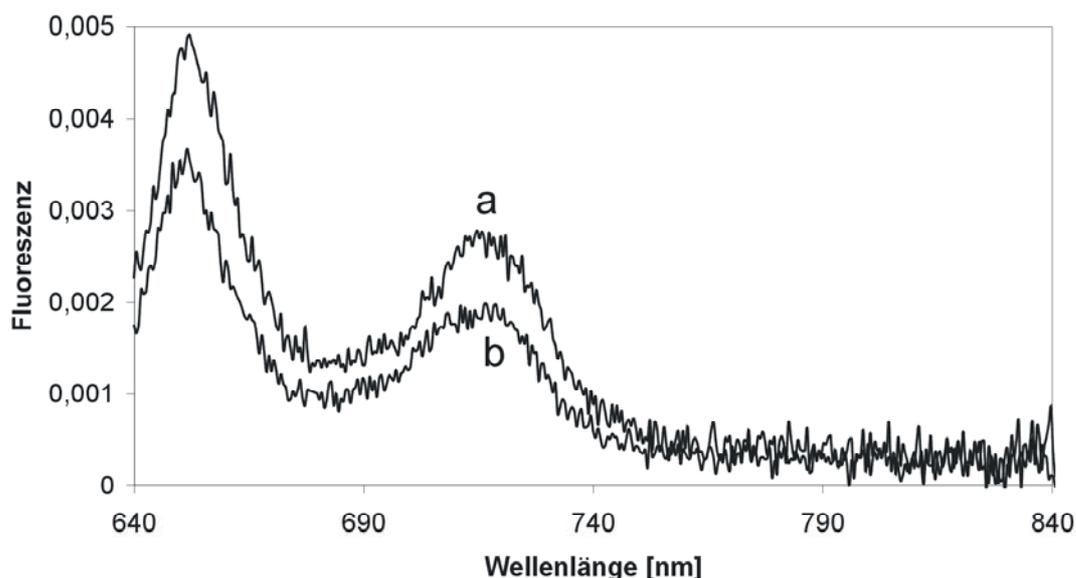


Abb.9.1: Octacarbonsäureporphyrin **32**, "Zaun" aus Michael-Bolaamphiphil **8** und Funktionalisierung durch Methylamin auf einer Goldelektrode; a) vor, b) nach der Zugabe des Kupfer-pyridiniumporphyrins **34**

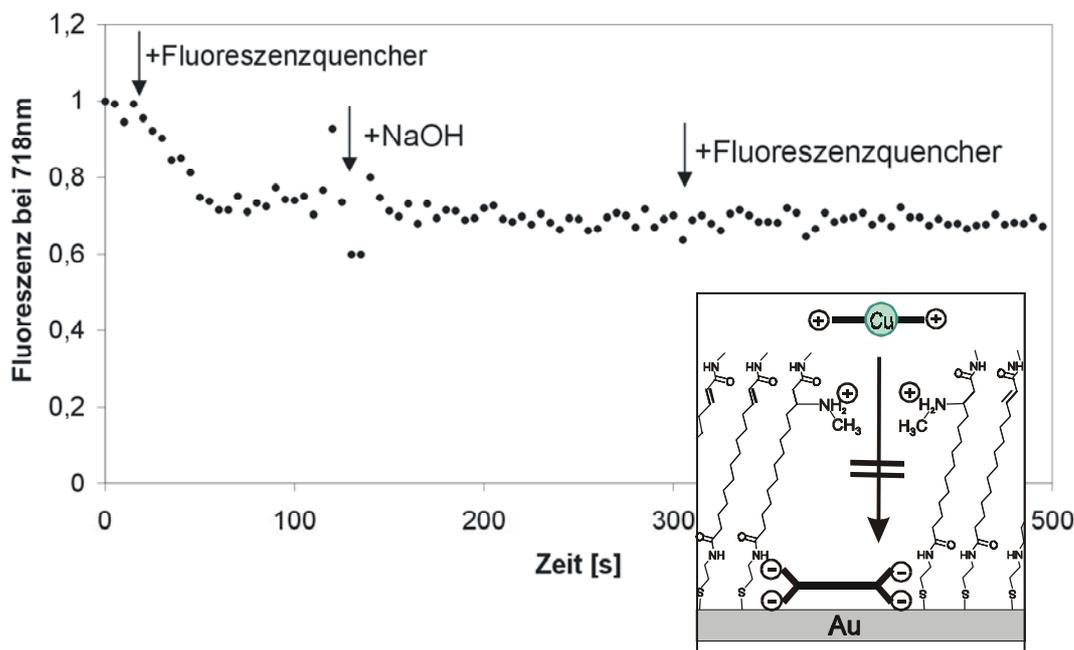


Abb.9.2: Fluoreszenz-Zeitverlauf nach Zugabe des Kupfer-pyridiniumporphyrins **34** und Schema der Blockade durch die Methylammoniumreste

Im Fluoreszenz-Zeitverlauf zeigte sich zuerst ein Abfall der Intensität, wobei die Geschwindigkeit vergleichbar mit den Versuchen der Fluoreszenzlöschung mit Lücken ohne Michael-Addition war. Bei einem Intensitätsabfall von 30 Prozent blieb die Fluoreszenzintensität hier aber konstant.

Die Größe und die abstoßende Ladung der Methylammoniumgruppe hat die Passage des ebenfalls positiv geladenen Kupfer-pyridiniumporphyrins **34** weitgehend verhindert. Nur bei einem kleinen Teil der Lücken gelang es dem Fluoreszenzlöcher **34** einzudringen (anfänglicher Abfall der Intensität); die Blockade durch die Methylammoniumgruppe war hier nicht ausreichend. Auch durch die Zugabe von wässriger NaOH-Lösung und einem größeren Überschuss des Fluoreszenzlöscher **34** konnte die Fluoreszenzintensität nicht verringert werden. Die Natronlauge mußte die Methylammoniumgruppen deprotoniert haben (pH 12), dennoch gelang es dem Fluoreszenzlöcher **34** nicht in die Lücke einzudringen. Das Kupfer-pyridiniumporphyrins **34** wurde offensichtlich schon durch die Größe der eingeführten Reste an dem Eintritt in die Lücke gehindert. Die abstoßende positive Ladung des Amins war für die Blockade nicht notwendig.