

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



MATHEMATISCH NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I  
INSTITUT FÜR PHYSIK

Diplomarbeit  
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES  
DIPLOM-PHYSIKER

Vergleichende Untersuchungen der elektronischen Eigenschaften  
von strukturell ähnlichen Chlorinen und Bacteriochlorinen

eingereicht von  
Alonso M. Acuña Sánchez  
geb. am 21.05.1984 in Montréal, Québec (Kanada)

Berlin, Januar 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Beate Röder
2. Gutachter: P.D. Dr. Volkhard May

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Motivation</b>	<b>6</b>
<b>2. Zur Photophysik von Tetrapyrrolen</b>	<b>8</b>
2.1. Grundbegriffe . . . . .	8
2.1.1. Definition und Struktur der Tetrapyrrole . . . . .	8
2.1.2. Absorption von Licht . . . . .	10
2.1.3. Monomolekulare Deaktivierung . . . . .	11
2.2. Ein kurzer Einblick in die molekulare Symmetrie . . . . .	13
2.2.1. Das Übergangsdipolmoment . . . . .	14
2.2.2. Die metallfreien Porphyrine, Chlorine und Bacteriochlorine. . .	14
2.3. Das Vier-Orbital-Modell . . . . .	15
<b>3. Singulett-sauerstoff in biologischen Systemen</b>	<b>20</b>
3.1. Der Begriff der Photosensibilisierung . . . . .	20
3.2. Das O <sub>2</sub> -Molekül . . . . .	21
3.2.1. Elektronische Struktur . . . . .	22
3.2.2. <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> -Kinetik . . . . .	23
3.2.3. Zum Nachweis von Singulett-sauerstoff . . . . .	24
3.3. Der <i>ideale</i> Photosensibilisator . . . . .	25
<b>4. Materialien und Messmethoden</b>	<b>27</b>
4.1. Stationäre Absorptionsspektroskopie . . . . .	27
4.2. Stationäre Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	28
4.2.1. Messaufbau . . . . .	28
4.2.2. Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{Fl}$ . . . . .	28
4.2.3. Anregungsspektroskopie . . . . .	30
4.3. Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	31
4.3.1. Grundlage zur TCSPC . . . . .	31
4.3.2. Experimentelle Anordnung . . . . .	32
4.3.3. DAFS . . . . .	33
4.4. ps-TAS . . . . .	33
4.4.1. Messprinzip . . . . .	34
4.4.2. Zur Bestimmung der Interkombinationsquantenausbeute $\Phi_{ISC}$ .	35
4.4.3. Experimentelle Anordnung . . . . .	35
4.5. <sup>1</sup> O <sub>2</sub> -Lumineszenzmessung . . . . .	36
4.5.1. Messaufbau . . . . .	36
4.5.2. Anregung durch Laser-Licht . . . . .	37
4.5.3. Anregung durch LED-Licht . . . . .	37
4.5.4. Zur Bestimmung der Singulett-sauerstoff-Quantenausbeute $\Phi_{\Delta}$ .	38
4.6. Laser Flash Photolyse . . . . .	39
4.7. Die untersuchten Systeme . . . . .	40
<b>5. Stationäre Messungen</b>	<b>42</b>
5.1. Stationäre Absorption . . . . .	42
5.2. Stationäre Fluoreszenz . . . . .	43

5.3.	Anregungsspektroskopie . . . . .	45
5.4.	Diskussion . . . . .	46
5.4.1.	Über den Einfluss der Substituenten . . . . .	47
5.4.2.	Übergang von der Chlorin- zur Bacteriochlorinkonfiguration . .	48
5.4.3.	Die Benziporphyrine . . . . .	49
5.4.4.	Zur Flexibilität der Moleküle . . . . .	49
<b>6.</b>	<b>Zeitaufgelöste Messungen</b>	<b>50</b>
6.1.	Ergebnisse . . . . .	50
6.2.	Diskussion . . . . .	54
6.2.1.	Zur Nicht-Planarität der Moleküle . . . . .	54
6.2.2.	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> -Generierung . . . . .	56
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion und Ausblick</b>	<b>57</b>
<b>A.</b>	<b>UV-VIS- und Fluoreszenzspektren</b>	<b>67</b>
<b>B.</b>	<b>Mathematica-Quelltext zum Auswerten von Anregungsspektren</b>	<b>71</b>
<b>C.</b>	<b>DAFS-Spektren</b>	<b>73</b>
<b>D.</b>	<b>ps-TAS Spektren</b>	<b>76</b>
<b>E.</b>	<b>ESI-Daten des Bacteriochlorins BC-5</b>	<b>79</b>
<b>F.</b>	<b>Kultivierung von HL60-Zellen und Inkubation der HL60-Zellen mit Photosensibilisatoren</b>	<b>80</b>
F.1.	Phototoxizitätstest an HL60-Zellen mittels MTT-Assay . . . . .	80
F.2.	Nachweis der intrazellulären Aufnahme der Photosensibilisatoren mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie . . . . .	81

## Tabellenverzeichnis

1. Ausgangskonzentrationen bei der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten . . . . .	28
2. Spektrale Lage der Extinktions- und Fluoreszenzmaxima, sowie Fluoreszenzquantenausbeuten aller untersuchten Verbindungen . . . . .	44
3. Photophysikalische Parameter . . . . .	52

## Abbildungsverzeichnis

1. Schematische Darstellung des molaren Extinktionskoeffizienten sowie der Transmission ausgewählter Photosensibilisatoren im sichtbaren spektralen Bereich . . . . .	7
2. IUPAC-Nomenklatur . . . . .	8
3. Strukturformeln von zwei in der Natur vorkommenden Tetrapyrrolen . . . . .	9
(a). Protohäm IX . . . . .	9
(b). IUPAC-Darstellung des Chlorophylls <i>a</i> . . . . .	9
4. Zum Franck-Condon-Prinzip . . . . .	11
5. Jablonski-Diagramm . . . . .	12
6. Lewisdarstellung von TPP . . . . .	15
7. Absorption und Fluoreszenz von TPP . . . . .	15
8. Orbitale und Zustände des $(4\nu+2)$ -Polyenes . . . . .	16
9. Molekülorbitale des Porphins . . . . .	17
10. Schematische Darstellung der Energieniveaus der MOs für Porphin, Chlorin und Bacteriochlorin . . . . .	18
11. Zum Selbstversuch von F. Meyer Betz . . . . .	20
12. Das $O_2$ -Molekül im Grundzustand und seine ersten drei angeregten Zustände. . . . .	22
(a). Potentialkurven (nach [20]) . . . . .	22
(b). Elektronische Konfiguration . . . . .	22
13. Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur photosensibilisierten Generierung von $^1O_2$ . . . . .	25
14. Prinzipieller Aufbau eines Spektrophotometers in Zweistrahlkonfiguration . . . . .	27
15. Schematischer Aufbau des verwendeten Fluoreszenzmessplatzes . . . . .	29
16. 3D-Darstellung des Anregungsspektrums von C-2 . . . . .	30
17. Messprinzip der Einzelphotonenzählung . . . . .	31
18. Schematischer Aufbau des verwendeten TCSPC-Messplatzes . . . . .	32
19. Zum Pump-Probe-Verfahren . . . . .	34
20. Die drei Transienten eines Zwei-Niveau-Systems . . . . .	35
21. Schematischer Aufbau der ps-TAS Messanlage . . . . .	36
22. Schematischer Aufbau des Messplatzes zur Detektion von $^1O_2$ -Lumineszenz . . . . .	37
23. Schematischer Aufbau der LED-Köpfe beim Singulett-Sauerstoff-Messplatz . . . . .	38
24. Schematischer Aufbau des Flash Photolyse Messaufbaus . . . . .	40
25. Übergang vom Porphin zum Chlorin und zum Bacteriochlorin . . . . .	40
26. Untersuchte Moleküle . . . . .	41

27.	Absorptionsspektrum der untersuchten Chlorine . . . . .	42
28.	Absorptionsspektrum der untersuchten Bacteriochlorine . . . . .	43
29.	Normierte Fluoreszenzspektren der Verbindungen C-2 und BC-2 . . . . .	45
30.	Anregungsspektren von zwei Verbindungen . . . . .	45
	(a). Chlorin C-2 . . . . .	45
	(b). Bacteriochlorin BC-2 . . . . .	45
31.	Anregungsspektrum der Verbindung BC-5 . . . . .	46
32.	Rekonstruktion des Absorptionsspektrums von C-2 . . . . .	47
33.	Korrelation der Parameter $\Delta\nu$ und $\Phi_{Fl}$ . . . . .	50
34.	TCSPC-Fit und DAFS-Spektrum des Chlorins C-2 . . . . .	51
35.	Ergebnisse der ps-TAS-Messung des Chlorins C-6 . . . . .	53
36.	Ergebnisse der ps-TAS-Messung des Bacteriochlorins BC-5 . . . . .	53
37.	3D-Visualisierung des Chlorins C-2 . . . . .	54
38.	3D-Visualisierung der Benziporphyrine . . . . .	55
	(a). BC-4 . . . . .	55
	(b). BC-5 . . . . .	55
39.	Korrelation der Triplett-Parameter mit dem Distortionsgrad $\eta$ . . . . .	55
40.	MTT-Test zur Phototoxizität . . . . .	58
41.	Konfokalmikroskopische Aufnahme von HL60-Zellen inkubiert mit BC-4 . . . . .	59

# 1. Einleitung und Motivation

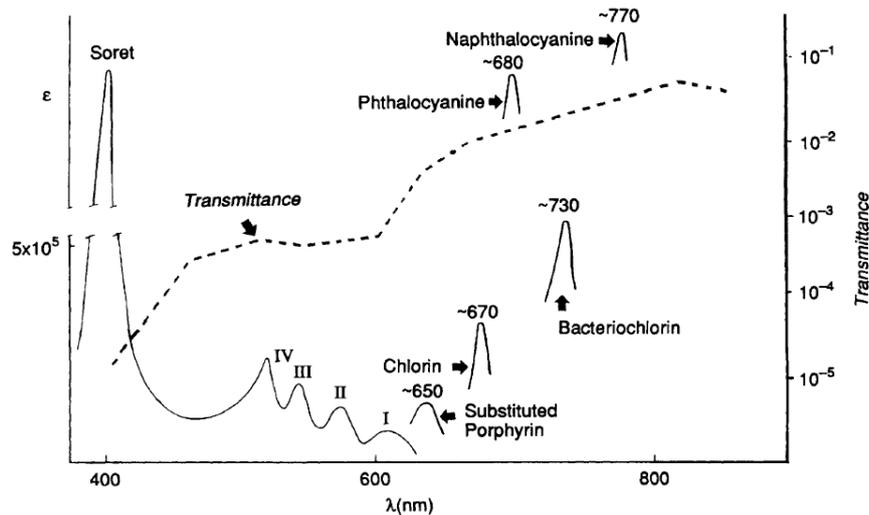
Licht spielt für das Leben auf der Erde eine existentielle Rolle. Bereits bei der photodissoziativen Freisetzung von Sauerstoff aus Wasser in früheren Stadien der Erdgeschichte war die Wechselwirkung zwischen der Sonnenstrahlung und den auf der Erde vorhandenen Molekülen in Bezug auf Entstehung, Entwicklung und Erhaltung des Lebens entscheidend wichtig.

Mit der Bildung der Hauptbestandteile biologisch relevanter Moleküle (Zucker, Aminosäuren, Nukleoside, Nukleotide und Peptide) unter anaeroben Bedingungen und Nutzung von UV-Strahlung war die Grundlage geschaffen für die Entstehung von Biopolymeren[7]. Bedingung für die Erhaltung dieser Informationsträger war jedoch auch die Entwicklung der Fähigkeit, sich vor der photodestruktiven Wirkung der UV-Strahlung zu schützen. Ebenso erkennt man bei einer Vielzahl von komplexeren Lebewesen beim Zusammenspiel zwischen Licht und Molekülen sowohl positive oder stimulierende (u.a. Sehprozess, Phototaxis, Wärmesensoren, Stoffwechselfvorgänge), als auch schädigende, auch sogenannte phototoxische Wirkungen. Ein Beispiel hierfür sind die Sonnenbrandschäden oder gar die Formation bösartiger Melanome[13].

Phototoxische Reaktionen können allerdings auch nach Absorption von Licht im sichtbaren oder nahen infraroten (NIR-)Bereich durch sogenannte Photosensibilisatoren (PS) ausgelöst werden[21, 22]. Beim o.g. Beispiel des Sonnenbrandes wird das einfallende Licht auch zum Teil durch PS-Moleküle absorbiert, die durch Einergietransfer molekularen Sauerstoff aktivieren. Dies ist das Prinzip der photosensibilisierten Generierung von Singulett-Sauerstoff[23, 29, 31], welcher besonders reaktionsfreudig ist und eine Schädigung der Haut hervorruft.

Gerade auf diesem Prinzip beruht die Photodynamische Therapie (PDT)[37, 84]. Der PS wird intravenös in den Bereich des Tumorgewebes eingebracht, wo er gezielt bestrahlt wird und somit Singulett-Sauerstoff in der unmittelbaren Nachbarschaft der Krebs erkrankten Zellen generiert. Hierdurch wird der apoptotische Zelltod erzielt. Der große Vorteil im Vergleich zur Photochemotherapie beruht auf der Nutzung von Licht im roten bis NIR-Spektralbereich, welches durch Biomoleküle wie z.B. den Hämfarbstoff nicht mehr absorbiert wird, und in der katalytischen Wirkung der PS-Moleküle, d.h. in ihrer Fähigkeit, in mehrmaligen Zyklen, das Licht zu absorbieren und die Sauerstoffaktivierung zu gewährleisten.

Mit Blick auf das Potential dieser vielversprechenden alternativen Therapieform wurde in den letzten 30 Jahren intensiv nach geeigneten PS-Molekülen gesucht. Dabei zeigte sich, dass Tetrapyrrole, aufgrund ihrer elektronischen Eigenschaften, besonders gute Kandidaten für die PDT sind[72]. Die PDT beschränkt sich auf die Behandlung von oberflächennahen Läsionen bzw. Tumoren weil die wellenlängenabhängige Eindringtiefe des Lichtes im besten Falle nur einige *mm* beträgt. Dies gilt für Licht im roten und NIR-Spektralbereich[42]. Aus diesem Grunde ist es besonders wichtig, dass der Photosensibilisator auch in diesem Spektralbereich gut absorbiert. Diese Bedingung ist für zwei spezielle Unterklassen von Tetrapyrrolen gut erfüllt: die Chlorine und die Bacteriochlorine zeigen jeweils eine verstärkte Absorption im Bereich  $\sim 670\text{nm}$  und  $\sim 730\text{nm}$ , wie in Abb. 1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des molaren Extinktionskoeffizienten sowie der Transmission ausgewählter Photosensibilisatoren im sichtbaren spektralen Bereich: die gestrichelte Kurve gibt näherungsweise die Transmission bei menschlichem Gewebe an. Die eingezeichneten Peaks beziehen sich auf die Bande I der PS-Moleküle. (nach [24])

Die ausführliche Untersuchung von sieben synthetischen Chlorinen und Bacteriochlorinen ist Ziel dieser Arbeit. Dabei soll der Fokus auf die photophysikalische Charakterisierung dieser Verbindungen angesichts ihrer Anwendung in der PDT gerichtet werden. Zudem sollen die photophysikalischen Eigenschaften miteinander verglichen und grundlegende physikalische Zusammenhänge diskutiert werden. Mit dieser Absicht werden wir in Kapitel 2 die theoretischen Grundlagen zur Photophysik der Tetrapyrrole und insbesondere der Chlorine und der Bacteriochlorine vorstellen. In Kapitel 3 wird die photosensibilisierte Generierung von Singulett-Sauerstoff besprochen. Auf die Messmethoden, sowie die untersuchten Systeme wird in Kapitel 4 eingegangen. Die Ergebnisse werden in Kapiteln 5 & 6 vorgestellt und ausführlich diskutiert. Schließlich enthält Kapitel 7 eine zusammenfassende Diskussion, einen ersten Handversuch in einem biologischen System sowie den Ausblick dieser Arbeit.

## 2. Zur Photophysik von Tetrapyrrolen

Zu Beginn sollen die wesentlichen Werkzeuge für die Untersuchung besonderer Tetrapyrrole, nämlich Chlorine und Bacteriochlorine, vorgestellt werden. Dafür sollen zunächst die für die Photophysik der untersuchten Moleküle unabdingbaren Grundbegriffe eingeführt werden. Weiterhin soll der theoretische Rahmen, der seit den 60er Jahren zur Verfügung steht, besprochen werden. Somit wird sich eine erste Skizze ergeben, die zeigen wird, wie und was man über diese Verbindungen erfahren kann.

### 2.1. Grundbegriffe

Dieser Abschnitt behandelt für diese Arbeit sehr wichtige Grundbegriffe: von der Definition und Klassifikation makrozyklischer Tetrapyrrole über die Wechselwirkung von Licht mit Molekülen bis zu den wesentlichen monomolekularen Deaktivierungsmechanismen, sollen hier die photophysikalischen Grundlagen geschaffen werden, die für die spätere Interpretation der Ergebnisse unabdingbar sind.

#### 2.1.1. Definition und Struktur der Tetrapyrrole

Pyrrole sind zyklische, außerordentlich stabile Strukturen, die aus vier C- und einem N-Atom bestehen. Ein Wasserstoffatom ist an jedem der gerade genannten Atome gebunden.

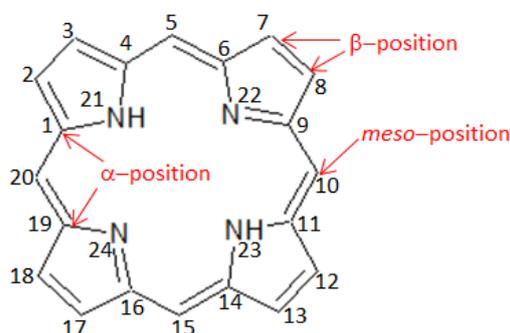
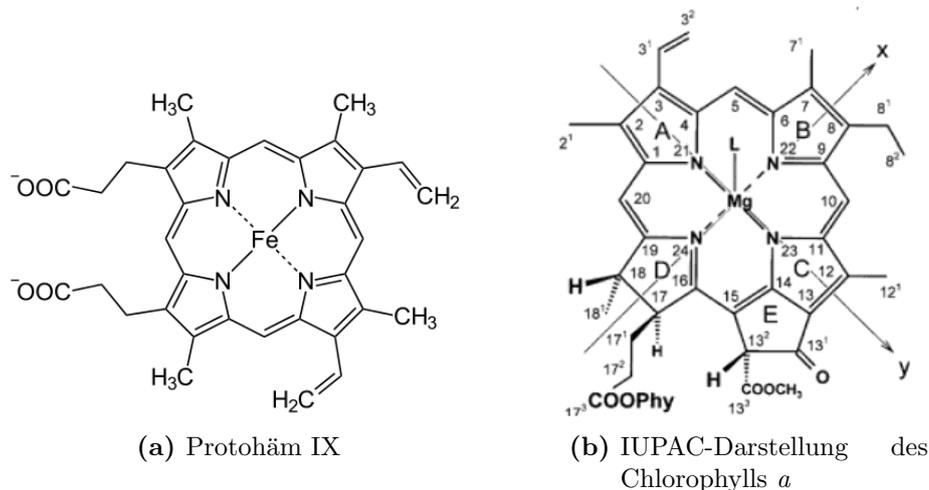


Abb. 2: IUPAC-Nomenklatur

Ein zyklisches Tetrapyrrol entsteht durch Verbinden vier solcher Pyrroleinheiten mittels Methingruppen der Form  $=C-$  und tendiert dazu, ein rigides, planares Gerüst zu bilden[41]. Da diese Art von Verbindungen sehr wichtige Rollen in der Natur spielen (z.B. bei physiologischen sowie Stoffwechselprozessen) werden sie weltweit intensiv untersucht. Deshalb hat die IUPAC die in Abb. 2 dargestellte Nomenklatur vorgeschlagen[86], in welcher jedes Atom des unsubstituierten Grundgerüsts (Porphin) durchnummeriert wird. Die eingebürgerten Bezeichnungen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und *meso*- werden zwar in dieser Arbeit verwendet stammen aber nicht aus der IUPAC-Nomenklatur.

Will man bei der Namengebung die Substituenten (oder auch die evtl. reduzierten Doppelbindungen) gleich erörtern können, so ist es notwendig, sich auf diese internationale Konvention zu beziehen. Man unterscheidet verschiedene Unterklassen von Tetrapyrrolen in Abhängigkeit u.a. von den Substituenten, Zentralatomen oder zusätzlichen Ringen. Alle zu präsentieren würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb wir zunächst nur einige interessante Vertreter besprechen.

**Porphyryne** Das Protohäm IX im Hämoglobin gehört der Porphyringruppe an und ist für den Stoffwechsel bei heterotrophen Organismen unabdingbar. Diese Verbindung



**Abb. 3:** Strukturformeln von zwei in der Natur vorkommenden Tetrapyrrolen

gehört zu den Metalloporphyrinen, denn sie enthält ein Fe-Atom in der Mitte des Ringes (siehe Abb. 3a). Seine physiologische Funktion betrifft das reversible Anbinden sowie den Transport von Sauerstoff im Organismus[67]. Synthetische Porphyrine haben vielfältige Anwendungen: von Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie (PDT)[72] bis zu Bauteilen im Bereich der molekularen Elektronik[69].

**(Bacterio-)chlorophylle** Diese Art von Tetrapyrrolen gehört mit Sicherheit zu den am reichlichsten vorhandenen Pigmenten in der Natur. Die Photosynthese in Pflanzen ist vielleicht der erwähnenswerteste Prozess an dem sie teilnehmen: nach Lichtabsorption findet ein sehr effektiver Energietransfer ins Reaktionszentrum statt, wo als nächstes ladungsseparierten Zustände entstehen und es zum Elektronentransport kommt. Strukturell unterscheiden sie sich von den Porphyrinen durch einen zusätzlichen isozyklischen Ring. Chlorophyll *a* besitzt Mg als Zentralatom und ist in Abb. 3b abgebildet und nach der IUPAC-Nomenklatur durchnummeriert.

In Bakterien wie dem *Chloroflexus aurantiacus* findet man Chlorophylle, die der Phytyochlorinreihe angehören: Diese werden Bacteriochlorophylle genannt. Es sind zudem solche bekannt, die sich im Zentralatom unterscheiden, wie z.B. das Zn-BChl  $\alpha$  im bei pH-Werten von 2.5–6.0 wachsenden Bakterium *Acidiphilium rubrum*[71]. Entgegen der Erwartung, die die Namensgebung weckt, gehören nicht alle Bacteriochlorophylle zu der Klasse der Bacteriochlorine. Hierzu die folgende Definition.

**(Bacterio-)chlorine** Ein wichtiges Kriterium zur Klassifizierung von Tetrapyrrolen ist schliesslich die Anzahl an vorhandenen  $\beta$ -positionierten Doppelbindungen. Die Anzahl von reduzierten Doppelbindungen lautet jeweils 0, 1 und 2 bei Porphyrinen, Chlorinen und Bacteriochlorinen. Man unterscheidet noch mit dem Präfix *iso*- die Bacteriochlorine, bei denen die 2-3, 7-8-positionierten Doppelbindungen der pyrrolischen Einheiten reduziert wurden (z.B. 7-8,12-13 in Abb. 2).

Im Übergang Porphyrin→Chlorin→Bacteriochlorin verändert sich das Absorptionsspektrum: es kommt zu einer Rotverschiebung der energetisch niedrigsten Banden und

ihre Extinktion nimmt zu. Aufgrund der guten Absorptionsfähigkeit in diesem Spektralbereich kommen sie als PS für die PDT in Frage. In der Natur findet man (Metallo-)chlorine und Bacteriochlorine vor allem in photosynthetischen Organismen, wo sie an Energie- sowie Elektronentransfer teilnehmen[76]. Abgesehen von Chlorophyll  $c$  sind alle Chlorophylle auch Chlorine[82].

### 2.1.2. Absorption von Licht

Für die Lichtabsorption durch Moleküle gilt das Lambert-Beer-Gesetz. Dieses besagt, dass die Intensität  $I_0$  eines einfallenden Lichtstrahles nach Durchlaufen einer Strecke  $l$  innerhalb einer Probe mit absorbierenden Molekülen folgendermaßen abnimmt:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l} \quad (1)$$

wobei  $\varepsilon(\lambda)$  (in  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) der wellenlängenabhängige dekadische molare Extinktionskoeffizient und  $c$  die Konzentration der Lösung ist. Die Grösse im Exponenten nennt man optische Dichte (OD).

Abweichungen vom Lambert-Beer-Gesetz treten u.a. dann auf, wenn Moleküle untereinander wechselwirken, oder auch wenn durch sehr intensive Lichteinstrahlung ( $I_0 > 10^{22} \cdot cm^2 \cdot s^{-1}$ ) nicht-lineare Prozesse ablaufen. Ein weiterer spezieller Fall ergibt sich, wenn ein langlebiger Zustand bevölkert wird, sodass der absorbierende Grundzustand bereits während der Bestrahlung verarmt wird. Statt  $\varepsilon(\lambda)$  verwendet man oft in der Photobiophysik vor allem in Bezug auf Aggregationsprozesse[7] den Absorptionsquerschnitt  $\sigma(\lambda)$ :

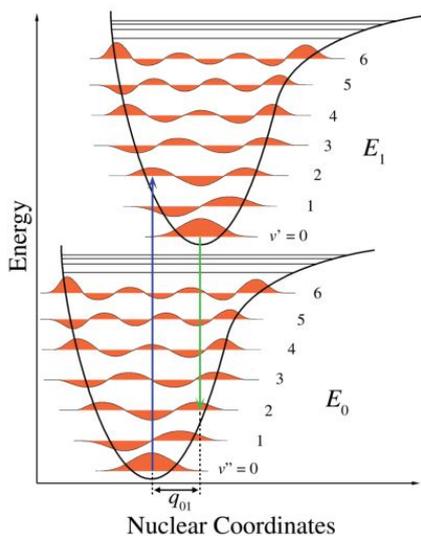
$$\sigma(\lambda) = \frac{\ln 10}{N_A} \cdot \varepsilon(\lambda) \approx 3,82 \cdot 10^{-21} \cdot \varepsilon(\lambda) \quad (2)$$

mit  $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} mol^{-1}$  der Avogadro-Konstante[8]. Somit erhält man die auch übliche, von der Molekülzahl je Volumeneinheit  $\mathbf{N}$  abhängige Definition der OD:

$$OD(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l = \frac{l}{\ln 10} \mathbf{N} \cdot \sigma(\lambda) \quad (3)$$

Die Struktur der Spektren ergibt sich aus elektronischen Übergängen, die von Änderungen des molekularen Schwingungszustandes begleitet werden, welche wiederum eine feinere, auf die Molekül-Rotation zurückzuführende Struktur aufweisen.

Wie intensiv diese Absorptionslinien (bzw. -banden) sind, wird einerseits durch die Besetzungsdichte, andererseits durch Übergangs-Matrixelementen zwischen zwei quantenmechanischen Zuständen bestimmt. Diese letzten werden mit den Hauptquantenzahlen  $n$  und  $n'$  (Energien  $E_n$  und  $E_{n'}$ ) und den Schwingungsquantenzahlen  $\nu'$  und  $\nu''$  charakterisiert sind (Rotationsenergie wird nicht betrachtet!).



**Abb. 4:** Zum Franck-Condon-Prinzip. (nach [12])

Eine erste wichtige Aussage ist das sogenannte Franck-Condon-Prinzip, welches besagt, dass während eines Elektronenüberganges weder die Geschwindigkeit noch die Lage der Kerne sich ändern. Man kann sich dieses Prinzip auch verbildlichen, indem man die Potentialkurven zweier elektronischer Zustände  $E_0$  und  $E_1$  mit entsprechenden Schwingungszuständen aufzeichnet.

Anschließend werden für jeden vibronischen Zustand die Wellenfunktionen überlagert. Man werde sich der Tatsache bewusst, dass die Amplitude der Kernwellenfunktion und damit die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Kerne in der Nähe der Umkehrpunkte (Schnittpunkte der Wellenfunktion mit der Potentialkurve) für wachsende  $\nu$  immer grösser wird. Dieses Verhalten stammt aus den Hermite'schen Polynomen, welche sich als Lösung der Schrödinger-Gleichung für den harmonischen Oszillator ergeben[75] und wird für  $\nu \geq 6$  recht deutlich.

Wenn sich die Kernkoordinaten  $q_i$  nicht ändern sollen, bedingt dies, dass die elektronischen Übergänge überwiegend senkrecht im Energiediagramm erfolgen (siehe Abb. 4). Quantenmechanisch verbietet das Franck-Condon-Prinzip andere Übergänge nicht, es besagt jedoch dass diese unwahrscheinlicher sind. Ausschlaggebend ist die Fläche, die sich aus dem Franck-Condon-Integral ergibt:

$$\int \chi_{\nu'}(q_i) \chi_{\nu''}(q_j) dV \quad (4)$$

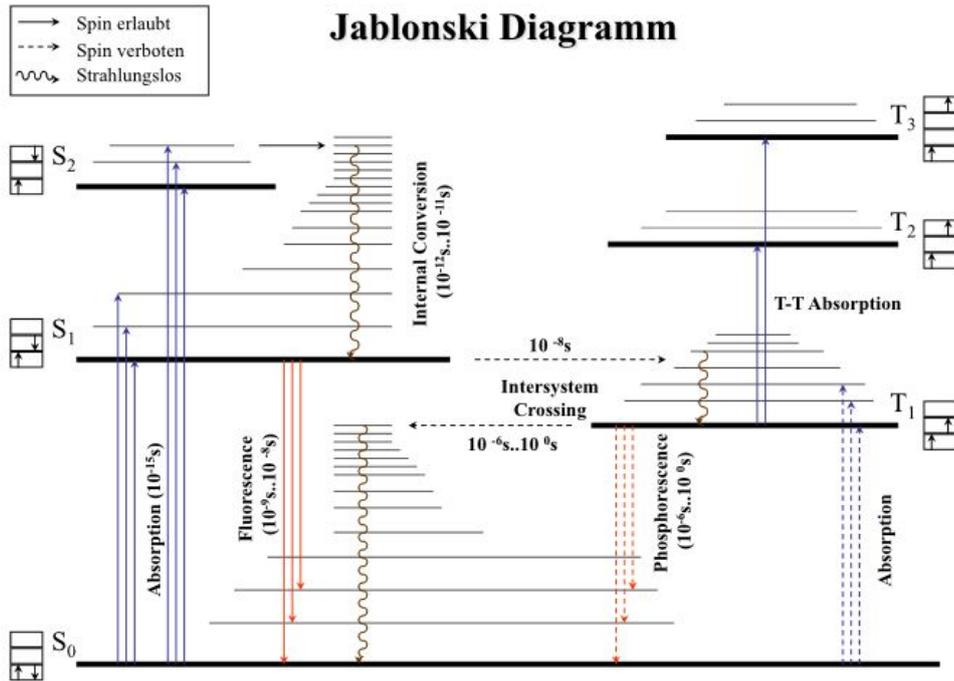
d.h. dem Überlappungsintegral der Kernschwingungsfunktion  $\chi_{\nu''}$ , die mit dem elektronischen Zustand  $E_i$  und Kernkoordinate  $q_i$  verknüpft ist, mit der Funktion  $\chi_{\nu'}$ , die zum elektronischen Anregungszustand  $E_j$  bei  $q_j$  gehört, integriert über das gesamte Molekül-Volumen. Den Term:

$$\left( \int \chi_{\nu'}(q_i) \chi_{\nu''}(q_j) dV \right)^2 = \langle \chi_{i,\nu''} | \chi_{j,\nu'} \rangle^2 \equiv S_{i\nu'',j\nu'} \quad (5)$$

nennt man Franck-Condon-Faktor (FCF) und er ist der Übergangswahrscheinlichkeit direkt proportional. Eine Annahme, die wir bisher stillschweigend zugrundegelegt haben, ist die der Trennbarkeit der Gesamtwellenfunktion in zwei voneinander unabhängige Wellenfunktionen: der Elektronenwellenfunktion und der hier besprochenen Kernschwingungswellenfunktion. Dies ist als Born-Oppenheimer-Näherung bekannt.

### 2.1.3. Monomolekulare Deaktivierung

Eine ausführlichere Beschreibung über die wichtigsten Mechanismen, die einem Molekül zur Verfügung stehen, um absorbierte Energie wieder abzugeben, bietet das Jablonski-Diagramm in Abb. 5 an. Eine Möglichkeit besteht in der Abgabe dieser Energie durch Schwingungen oder Rotation des Moleküls an die Umgebung. Solche strahlungslosen



**Abb. 5:** Jablonski-Diagramm: gezeigt werden elektronische Singulett- ( $S_n$ ) oder Triplet-Zustände ( $T_n$ ) und mehrere nicht durchnummerierte Schwingungszustände. In Klammern wird die Größenordnung der Ratenkonstanten der Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Intersystem-crossing und innere Umwandlung angegeben. (nach [13])

Prozesse, bei denen sich der Spin nicht ändert, fasst man im Ausdruck innere Umwandlung (IC: *internal conversion*) zusammen, sie sind z.B. dafür verantwortlich, dass Moleküle einen Teil der Anregungsenergie in kleinere Schwingungs- und Rotationsquanten umsetzen bevor sie Licht emittieren. Dieser Prozess erfolgt so schnell ( $10^{-12}$  bis  $10^{-11}$  s.) von höheren angeregten (Singulett-)Zuständen in den niedrigsten Schwingungszustand des ersten elektronischen angeregten Zustandes, dass man in der Tat fast ausschließlich die Fluoreszenz des  $S_1$ -Zustandes beobachten kann und zwar unabhängig von der Energie der Anregungsquanten (Regel von Kasha).

Ein weiterer wichtiger strahlungsloser Prozess bedingt eine Spinumkehr, wodurch Elektronen des Singulett- ins Triplet-System übergehen (und umgekehrt). Deshalb nennt man diesen Prozess Interkombination (ISC: *Intersystem Crossing*). Rein formell sind solche Übergänge verboten, für den Fall unterschiedlicher Multiplizität verschwindet jedoch das Übergangsmatrixelement des Nichtadiabasis-Operators, wodurch die adiabatische Spin-Bahn-Kopplung solche Übergänge wiederum ermöglicht[7]. Da die LS-Kopplung mit steigender Atomzahl zunimmt, beobachtet man in der Regel eine verstärkte Interkombination im Falle von Schweratome enthaltenden Molekülen (innerer Schweratomeffekt) bzw. Lösungsmitteln (äußerer Schweratomeffekt). Für eine ausführliche Diskussion siehe [64].

Als Fluoreszenz bezeichnet man den strahlenden Übergang aus angeregten elektronischen (nach Kasha  $S_1$ ) Zuständen in vibronische Zustände des Grundzustandes. Hier

gilt ebenfalls das o.g. Franck-Condon-Prinzip, d.h. bevorzugt sind diejenige Übergänge, die im Energiediagramm senkrecht dargestellt werden. Aus Abb. 5 kann man ablesen, dass die Übergangsenergien, die für die Fluoreszenz charakteristisch sind, höchstens denjenigen der Absorption entsprechen. Das Fluoreszenzspektrum ist demnach ein nach niedrigeren Energien verschobenes Spiegelbild der energetischen niedrigsten Absorptionsbande. Den energetischen Abstand zwischen energetisch niedrigstem Absorptions- und energetisch höchstem Fluoreszenzmaximum bezeichnet man mit *Stokes-shift*. Er wird üblicherweise in  $cm^{-1}$  angegeben.

Die vom Lösungsmittel oder auch von der Mikroumgebung abhängige, von der Temperatur jedoch unabhängige *natürliche* Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl,0} = 1/k_{Fl}$  gibt die strahlende Lebensdauer des emittierenden Zustandes an, solange die Fluoreszenz der einzige Deaktivierungskanal ist. Kennt man das Verhalten von  $\varepsilon(\nu)$  in der Umgebung der energetisch niedrigsten Bande, so kann  $k_{Fl}$  über die (z.B. in [8] definierten) Einsteinkoeffizienten  $A_{ik}$  für spontane und  $B_{ik}$  für induzierte Emission theoretisch abgeschätzt werden[25]. Eine direkte Messung ist allerdings nur bei Tieftemperaturen und Einbettung in einer Matrix möglich. In Lösung und bei Raumtemperatur wird die folgende Größe gemessen:

$$\tau_{Fl} = \frac{1}{k_{Fl} + k_{ISC} + k_{IC}} \quad (6)$$

wobei  $k_{ISC}$  und  $k_{IC}$  die Übergangsraten der strahlunglosen konkurrierenden Prozesse sind. Ausser der normalerweise im ns-Bereich liegenden Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl}$ , ist die Fluoreszenzquantenausbeute[13]:

$$\Phi_{Fl} = \frac{\tau_{Fl}}{\tau_{Fl,0}} \quad (7)$$

ein sehr wichtiger Parameter. Dieser wird im Abschnitt 4.2.2 näher besprochen. Grundsätzlich sind alle Größen in Gl. (7) experimentell unabhängig voneinander bestimmbar, sodass man sie miteinander vergleichen kann.

Schlussendlich sind in Abb. 5 noch strahlende Übergänge vom  $T_1$ - zurück in den  $S_0$ -Zustand zu sehen: die Phosphoreszenz. Aufgrund der notwendigen, nochmaligen Spinumkehr können Phosphoreszenzlebensdauern  $\tau_{Ph}$  bis zu einigen Sekunden betragen. Den  $T_1$ -Zustand nennt man dementsprechend metastabil.

## 2.2. Ein kurzer Einblick in die molekulare Symmetrie

Molekulare Symmetrie und Gruppentheorie stellen ein sehr hilfreiches Werkzeug zur Beschreibung molekularer Systeme dar. Einer der attraktiven Aspekte der Symmetrie besteht z.B. darin, die Art von Bindung zwischen Atomen oder Atomgruppen, die überhaupt entstehen *kann*, bildlich zu begründen. Desweiteren ermöglichen Symmetriebetrachtungen die Vorhersage von Übergängen zwischen zwei energetischen Niveaus, sodass man Rückschlüsse auf das Absorptionsverhalten ziehen und somit Absorptionsspektren (zumindest in etwa) voraussagen kann.

Mittels der zu den Symmetriegruppen gehörenden Charaktertafeln lassen sich sogenannte irreduzible Darstellungen finden, mit Hilfe derer man die möglichen Konfigurationen der Zustände rekonstruiert. Gehört ein gegebenes Molekül  $M$  zur Punktgruppe  $\Lambda$  ( $M \in \Lambda$ ), so müssen sämtliche Molekülorbitale Basen für irreduzible Darstellungen von  $\Lambda$  bilden (Theorem der Gruppentheorie). Für eine allgemeine Einführung in die Gruppentheorie siehe [54], für eine übersichtliche Diskussion über molekulare Symmetrie und Anwendungen siehe [18, 38, 55].

### 2.2.1. Das Übergangsdipolmoment

Mit einfachen Worten stellt das Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}$  ein Maß für die Änderung der Ladungsverteilung in einem gegebenen Molekül bei einem Übergang dar. Indiziert man Kerne mit  $q$ , Elektronen mit  $n$  so lautet die Definition des Übergangsdipolmomentes:

$$\vec{\mu} \equiv e \left\langle \sum_q Z_q \vec{r}_q - \sum_n \vec{r}_n \right\rangle \quad (8)$$

wobei  $e$  die Elementarladung,  $eZ_q$  die gesamte Kernladung ist. Quantenmechanisch schreibt man den Übergangsdipoloperator  $\hat{\mu}_{ij}$  für einen Übergang zwischen dem  $i$ -ten und dem  $j$ -ten Energieniveau als:

$$\hat{\mu}_{ij} = \langle \Psi_j | \hat{\mu} | \Psi_i \rangle \approx S_{i\nu'', j\nu'} \cdot \hat{\mu}_{el, ij} \quad (9)$$

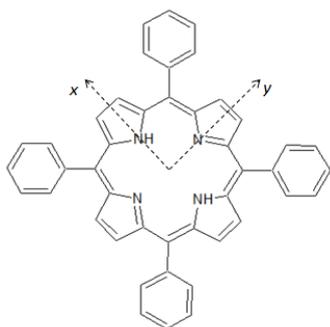
wobei wir die Näherung gemäß Gl. (5) vollzogen und  $\hat{\mu}_{el, ij}$  den elektronischen Anteil des Übergangsdipoloperators darstellt.

Es ist oft sinnvoll, Symmetrieargumente als Hilfsmittel heranzuziehen um von vornherein zu bestimmen, ob ein Molekül, nicht etwa allein aufgrund seiner symmetrischen Eigenschaften, ein verschwindendes Dipolmoment hat. Elektronische Übergänge der Form  $|\Psi_i\rangle \rightarrow |\Psi_j\rangle$  sind nur dann erlaubt, wenn das Produkt der jeweiligen Wellenfunktionen die gleichen Symmetrieeigenschaften hat wie eine der Komponenten von  $\vec{\mu}_{ij}$  [7]. Dies ist die sogenannte Symmetrierauswahlregel.

### 2.2.2. Die metallfreien Porphyrine, Chlorine und Bacteriochlorine.

Vom Standpunkt der molekularen Symmetrie ist es naheliegend, die Eigenschaften der metallfreien Porphyrine (*free base*) mit Hilfe der Metalloporphyrine einzuführen. Ein Beispiel für Metalloporphyrine kennen wir bereits aus Abb. 3a. Vorausgesetzt, dass die elektronischen Eigenschaften dieses Moleküls allein durch das konjugierte Elektronensystem bestimmt sind, kann man von den Substituenten an den äußeren Kohlenstoffatomen absehen und somit würde es zu der  $D_{4h}$ -Punktgruppe gehören. Solche Moleküle, zu denen Chlorophylle ebenfalls gehören, besitzen ein charakteristisches *zwei-Banden*-Spektrum, welches in [81] ausführlich diskutiert wurde.

Basierend auf der typischen Oszillatorstärke von Chlorophyllen sowie auf der der spektralen Lage der niederenergetischen Übergänge, geht man davon aus, diese seien  $\pi$ - $\pi$ -Übergängen[79]. Diese erfolgen aus dem höchsten besetzten (HOMO: *highest occupied molecular orbital*) in den niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO: *lowest unoccupied molecular orbital*). Zudem gehören die angeregten Zustände zu der  $E_{1u}$ -Symmetrie, d.h. es sind zwei entartete Zustände vorhanden[78]. Die Entartung ist wiederum durch die Äquivalenz von  $x$ - und  $y$ -Achse gewährleistet (s. Abb. 3b), sodass man sinnvollerweise die Bezeichnungen  $B_x$ ,  $B_y$ ,  $Q_x$  und  $Q_y$  einführt[59].



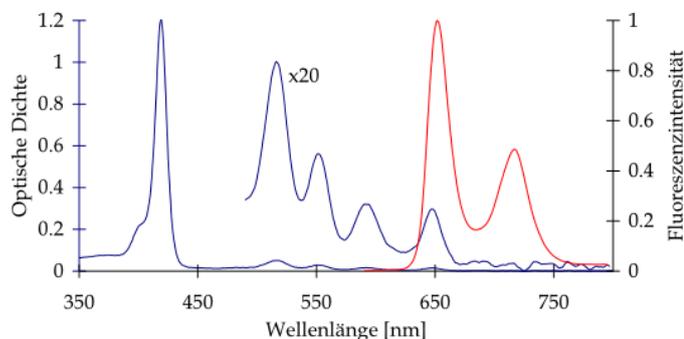
**Abb. 6:** Lewisdarstellung von TPP

Im Falle der *free base* Porphyrine wird die  $D_{4h}$ -Symmetrie durch das Fehlen des Zentralatoms gebrochen. Somit unterscheiden sich die Übergangsdipolmomente in  $x$ - und  $y$ -Richtung (s. Abb. 6). Für Moleküle dieser  $D_{2h}$ -Symmetrie erfolgt eine Aufspaltung der  $Q$ -Banden in  $Q_x(0-0)$ - und  $Q_y(0-0)$ -Komponenten, die typischerweise  $3000\text{cm}^{-1}$  auseinanderliegen[10]. Aufgrund der noch dazukommenden vibronischen Anteile  $Q_x(0-1)$  und  $Q_y(0-1)$  entsteht ein charakteristisches *sechs-Banden*-Spektrum.

In der vorliegenden Arbeit werden metallfreie Verbindungen untersucht, die aber nicht der *Porphyrin*-, sondern der *Chlorin*- bzw. *Bacteriochlorin*-reihe angehören. Die Reduktion der Doppelbindungen der pyrrolischen Einheiten bringt, auch aufgrund der Symmetriebrechung, drastische Veränderungen in den Spektren mit sich. Solche Moleküle besitzen eine noch niedrigere Symmetrie als  $D_{2h}$  und lassen sich mit Hilfe des Vier-Orbital-Modells erklären.

### 2.3. Das Vier-Orbital-Modell

Das Vier-Orbital-Modell [57, 59] von Martin Gouterman bietet eine korrekte Erklärung für die Spektren verschiedener Porphyrine an und ermöglicht quantitative Aussagen. Abb. 7 zeigt das Absorptionsspektrum von TPP (Abb. 6), welches repräsentativ ist für jedes Porphyringerüst ohne Zentralatom. Eine im UV-Bereich liegende Soret-Bande; im sichtbaren Bereich vier beträchtlich weniger intensive Banden, die sog.  $Q$ -Banden. M. Gouterman stützt sich auf verschiedene, vor ihm erstellte Theorien, welche unterschiedliche Beiträge zur Erklärung von Porphyrinspektren lieferten.



**Abb. 7:** Absorption und Fluoreszenz von TPP. (nach [70])

W. Simpson[56] hatte das Porphin mit dem Modell der freien Elektronen behandelt. Das Porphyringerüst wurde auf einen Ring mit 18 Elektronen zurückgeführt und anhand einfacher Orbitale der Form  $\sim e^{in\phi}$  wurden Übergangsenergien zwischen HOMOs ( $n = \pm 4$ ) und LUMOs ( $n = \pm 5$ ) mittels  $E_n = (\hbar^2/2mR^2)n^2$  für hypothetische Ringe vom Radius  $R \approx 4\text{\AA}$  berechnet. Dieses Modell schrieb die Soret-Bande Übergängen mit  $\Delta L_z = \pm 1$  richtig zu, platzierte die Absorption vom Porphin bei Wellenlängen um die  $\lambda_P \approx 615\text{nm}$  herum, also bereits im erwünschten VIS-Bereich, sagte jedoch die Aufspaltung der Q-Banden ( $\Delta L_z = \pm 9$ ) nicht vorher und scheiterte erst recht beim Versuch, Triplett-Triplett Absorptionsspektren zu erklären.

W. Moffitt gab in [61] ausgehend von Symmetrie- sowie störungstheoretischen Überlegungen eine sehr gründliche Beschreibung der Molekülorbitale des  $(4\nu+2)$ -Polyenes an. Dabei werden LCAO (LCAO: *Linear Combination of Atomic Orbitals*) Orbitale  $\Psi_n$  folgender Form angegeben:

$$\Psi_n = N \sum_{p=1}^{16} \exp\left(\frac{2\pi i n p}{16}\right) \cdot \chi_p \quad (10)$$

wobei  $N$  der Normierungsfaktor,  $\chi_p$  ein  $p$ -zentriertes Atomorbital ist. Die  $\Psi_n$  spannen eine irreduzible Darstellung der räumlichen Symmetriegruppe  $D_{4\nu+2} = C_{4\nu+2} \times C_s$  auf. Die für elektronische Übergänge relevanten Orbitale sind zwei entartete Paare von jeweils  $e_\nu$ - und  $e_{\nu+1}$ -Symmetrie, wobei die  $e_\nu$ -Orbitale voll besetzt sind. Die Übergänge  $|e_\nu\rangle \rightarrow |e_{\nu+1}\rangle$  führen dann zu Singulett-Zuständen mit Symmetrien  $E_{1u}$ ,  $B_{1u}$  und  $B_{2u}$  wie in Abb. 8 gezeigt. Dabei sei der  $\pi$ - $\pi$ -Dipolübergang in den zweifach entarteten  $E_{1u}$ -Zustand der einzige erlaubte. Hieraus kann man direkt ablesen, dass sich bei  $D_{4h}$ -Symmetrie zwei in  $x$ - und  $y$ -Richtung äquivalente Übergänge ergeben.

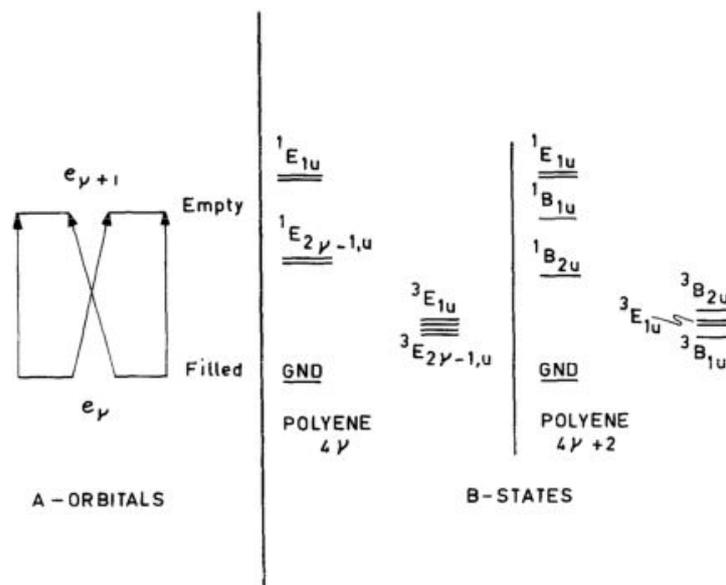
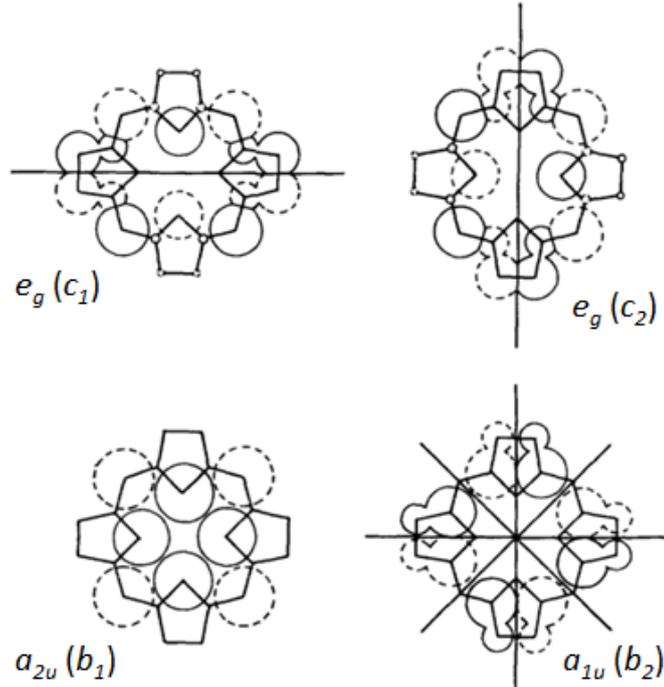


Abb. 8: Orbitale und Zustände des  $(4\nu+2)$ -Polyenes (nach [57])



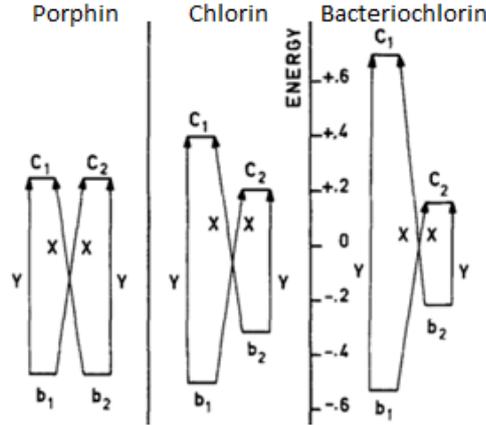
**Abb. 9:** Molekülorbitale des Porphins: Die berechneten Hückel Koeffizienten bestimmen die Größe der eingezeichneten Kreise. Durchgezogener bzw. gestrichelter Kreisumfang bedeutet unterschiedliches Vorzeichen. Symmetrieknoten sind durch durchgezogene Linien dargestellt. Die ursprüngliche Bezeichnung der Orbitale ersetzt Gouterman für Porphyrine niedrigerer Ordnung mit  $b, c$  usw. (nach [57])

Im Gegensatz dazu, geht bei den *free base* Porphyrinen die Äquivalenz von  $x$ - und  $y$ -Richtung (s. Abb. 6) verloren: die  $Q$ -Bande spaltet in die mit  $Q_x$  und  $Q_y$  bezeichneten Komponenten auf, wobei  $Q_x$  senkrecht zu  $Q_y$  polarisiert ist. Dies gilt natürlich für die  $B$ -Bande ebenso. Laut Moffitt kommen die energetischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zuständen durch die Konfigurations-Wechselwirkung (CI) erster Ordnung zustande.

Longuet-Higgins *et al.*[60] übernahmen die erste MO-Behandlung des zyklischen Polyenes. Mit expandierten Molekülorbitalen der Form:

$$\Psi_n = \sum_p C_{pn} \chi_p \quad (11)$$

berechneten sie sämtliche Hückel-Koeffizienten  $C_{pn}$  für ein Porphin und ein Tetrahydroporphyrin (Bacteriochlorin). Sie erhielten zwei HOMOs mit Symmetrien  $a_{2u}$  und  $a_{1u}$  sowie zwei entartete LUMOs mit  $e_g$ -Symmetrie, die in Abb. 9 für das Porphin graphisch dargestellt werden. Der bei höheren Energien liegende Übergang  $|a_{1u}\rangle \rightarrow |e_g\rangle$



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der Energieniveaus der MOs für Porphin, Chlorin und Bacteriochlorin. (nach [57])

konnte der Soret-Bande zugeordnet werden. Dementsprechend entsprach der Übergang  $|a_{2u}\rangle \rightarrow |e_g\rangle$  den  $Q$ -Banden. Die große Schwäche der MO-Rechnung liegt in der misslungenen Aussage über die Oszillatorstärken:  $B$ - und  $Q$ -Banden sollen gleich intensiv sein. Dies entspricht offensichtlich nicht der Beobachtung (s. Abb. 7).

M. Gouterman verbindet nun diese Theorien: ausgehend von den vier eben genannten Molekülorbitalen, stellte er die Hypothese auf, die zwei HOMOs seien *zufällig* entartet, sodass das Modell des Moffitt'schen zyklischen Polyenes wieder anwendbar wird. Sind  $|b_1\rangle$  und  $|b_2\rangle$  einerseits,  $|c_1\rangle$  und  $|c_2\rangle$  andererseits, entartet, wie in Abb. 8A zu sehen ist, so ergeben sich die ungestörten  $B$ - und  $Q$ -Porphinzustände  $B^0$  und  $Q^0$  aus der Mischung der Übergänge gleicher Polarisierung[57]:

$$\frac{1}{\sqrt{2}} \left( \langle c_2 | b_1 \rangle \pm \langle c_1 | b_2 \rangle \right) = \begin{cases} Q_x^0 \\ B_x^0 \end{cases}$$

$$\frac{1}{\sqrt{2}} \left( \langle c_1 | b_1 \rangle \pm \langle c_2 | b_2 \rangle \right) = \begin{cases} B_y^0 \\ Q_y^0 \end{cases}$$

wobei unter  $\langle c_1 | b_1 \rangle$  der Übergang  $|b_1\rangle \rightarrow |c_1\rangle$  zu verstehen ist. Die Reduktion einer Doppelbindung (Chlorin) bzw. zweier Doppelbindungen (Bacteriochlorin) hebt die Entartung dieser Zustände auf, denn die Elektronendichte hat für  $|b_2\rangle$  und  $|c_1\rangle$  einen namenhaften Wert an der Stelle der Reduktion (siehe Abb. 9).

Da der Potentialkasten der Elektronen durch die Reduktion kleiner wird, wandern die Energieniveaus zu höheren Energien hin. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 10 schematisch zusammengefasst.

Hier wird es ersichtlich, dass während die  $x$ -polarisierten Übergänge des Chlorins in etwa gleich wie jene des Porphins geblieben sind, die  $y$ -polarisierten Übergänge am meisten abweichen. Diese energetische Abweichung ist für eine Rotverschiebung sowie eine Intensitätszunahme der  $Q_y$ -Bande verantwortlich.

Schließlich, bei zweimaliger Reduktion, sorgen die erheblich großen Störungsparameter für eine effektivere Auflockerung des  $Q$ -Banden-Verbots, sodass diese stark erlaubt werden und folglich an Intensität gewinnen. Abb. 10 lässt außerdem eine Rotverschiebung der  $Q_y$ -Bande sowie eine Blauverschiebung der Soret- und  $Q_x$ -Banden des Bacteriochlorins im Vergleich zu jenen des Chlorins erwarten.

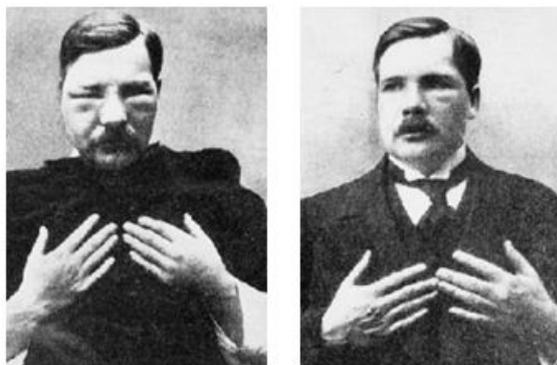
### 3. Singulett-Sauerstoff in biologischen Systemen

In diesem Abschnitt wird die zentrale Rolle von Singulett-Sauerstoff in Bezug auf den Mechanismus der *Photosensibilisierung* diskutiert. Was dieser Mechanismus potentiell für therapeutische Zwecke anzubieten hat, wird zunächst kurz zusammengefasst. Als nächstes befassen wir uns ausführlicher mit dem  $O_2$ -Molekül, um schließlich die spezifischen Anforderungen erkennen zu können, die man an chemische Verbindungen stellen muss, wenn solche als Photosensibilisatoren in der PDT dienen sollen.

#### 3.1. Der Begriff der Photosensibilisierung

Bereits im Jahr 1900 berichtete Oscar Raab[74] in der Münchner Medizinischen Wochenschrift über die phototoxische Wirkung fluoreszierender Substanzen. Im Rahmen seiner Dissertation untersuchte er die toxische Wirkung von Acridin auf Pantoffeltierchen (*Paramecium caudatum*) und entdeckte dabei zufällig, dass unterschiedliche Lichtverhältnisse zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Später stellte sein Lehrer H. von Tappeiner fest, dass weitere Farbstoffe (u.a. Eosin, Erythrosin und Chinin) in ähnlichen Versuchen im Dunkeln zu keiner, nach Lichtexposition jedoch zu einer höchst schädlichen Wirkung auf Pantoffeltierchen führten.

Harold Blum[21] definierte die photodynamischen Prozesse als die durch sichtbares Licht, in biologischen Systemen induzierten Reaktionen, welche unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff ablaufen. Ein illustrierendes Beispiel solcher einer Reaktion ist der in 1912 durchgeführte Selbstversuch von Friedrich Meyer Betz[73], bei dem er sich selbst 0,2 g Haematoporphyrin gespritzt hat (s. Abb. 11). Es zeigte sich eindrucksvollerweise, dass nicht die Substanz selbst, sondern diese in Kombination mit Sonnenbestrahlung erst zu einer erhöhten Hautsensibilisierung, die in seinem Falle zwei Monate lang anhielt, sowie zu

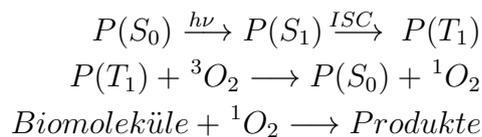


**Abb. 11:** Links: F. Meyer Betz am 14.10.1912 nach intravenöser Injektion von 200 mg Haematoporphyrin und anschließendem Aussetzen zum Tageslicht. Rechts: Das allergische Ödem ließ etwa zwei Monate später nach.

Schwellung und Hyperpigmentierung führte. Eine strengere Beschreibung dieses Effektes gelang C. Foote 1968, wobei er die Primärprozesse beschrieb, die zur Generierung von Singulett-Sauerstoff in biologischen Systemen führen. Nach Anregung vom Grundzustand  $S_0$  in den  $S_1$ -Zustand kann ein (beliebiger) Photosensibilisator wie z.B. ein Porphyrin durch Proton- oder Elektrontransfer an ein Substrat freie Radikale bilden. Dabei wird im häufigsten Fall das Substrat oxidiert und der Photosensibilisator reduziert[23]. Die freien Radikale können weiterhin mit Sauerstoff reagieren und aktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species: ROS*) wie Singulett-Sauerstoff aber

auch das Sauerstoffanionradikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ), Peroxiradikale ( $\text{ROO}\cdot$ ) sowie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) bilden. Diese Art Singulett-Sauerstoff zu generieren, kennt man heutzutage als Mechanismus vom TYP-I.

Der für diese Arbeit wichtigere TYP-II Mechanismus setzt voraus, dass der Photosensibilisator nach Anregung vom  $S_1$ - in den  $T_1$ -Zustand übergeht. Bei räumlicher Überlappung der Wellenfunktionen eines  $\text{O}_2$ -Moleküls und eines angeregten Photosensibilisators im Triplett-Zustand (Zusammenstoß), ist ein Triplett-Triplett-Energietransfer über einen Austauschmechanismus möglich[26], sodass das Sauerstoffmolekül von seinem Grundzustand ( $^3\Sigma_g^-$ ) in einen höheren Zustand gehoben wird (siehe Abb. 13). Wie wir in Abschnitt 3.2.1 sehen werden, zerfällt der  $^1\Sigma_g^+$ -Zustand ( $\approx 155 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) sehr schnell, wohingegen der  $^1\Delta_g$ -Zustand ( $\approx 94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) beträchtlich länger lebt. Der letzte ist üblicherweise gemeint, wenn man von *Singulett-Sauerstoff* redet. Im Rahmen der biophysikalischen Forschung interessiert man sich weiterhin für die Reaktionen zwischen dem so generierten Singulett-Sauerstoff und den sich in der Umgebung befindenden Biomolekülen. Besonders relevant sind in dieser Hinsicht die Lipide, denn diese dienen zum Membranenaufbau und sind als erstes vom oxidativen Stress betroffen. Zusammenfassend beinhaltet der TYP-II Mechanismus folgende Prozesse:



Bei Gilbert Laustriat ist in [65] von einem TYP-III Mechanismus die Rede, bei welchem Elektronentransfer-Prozesse sowie Radikalbildung eine Rolle spielen. Beim TYP-III Mechanismus wird zudem  $\text{O}_2$  verbraucht, weshalb es umstritten bleibt, ob es sich um einen zusätzlichen Mechanismus handelt.

Neben der photosensibilisierenden Generierung von Singulett-Sauerstoff sind chemische[27, 30] sowie biologische[28] Mechanismen bekannt. Diese sind für diese Arbeit allerdings nicht relevant und werden deshalb nicht behandelt.

### 3.2. Das $\text{O}_2$ -Molekül

In diesem Abschnitt befassen wir uns mit einem der für das Leben auf der Erde zweifellos wichtigsten Moleküle. Vom entscheidenden Zusammenspiel zwischen autotrophen und heterotrophen Organismen bis zu den toxischen Wirkungen aktivierter Sauerstoffspezies bleibt bis heute das  $\text{O}_2$ -Molekül eine äusserst interessante, aufgrund seiner speziellen Eigenschaften sehr intensiv untersuchte Verbindung. Da wir uns im Rahmen dieser Arbeit zum Teil mit der photosensibilisierenden Wirkung von Chlorinen und Bacteriochlorinen beschäftigen, erweist sich eine überblickende Diskussion der elektronischen Konfiguration sowie Deaktivierungsmechanismen von molekularem Sauerstoff als unumgänglich. Im Unterabschnitt 3.2.3 wird speziell der Nachweis von Singulett-Sauerstoff behandelt.

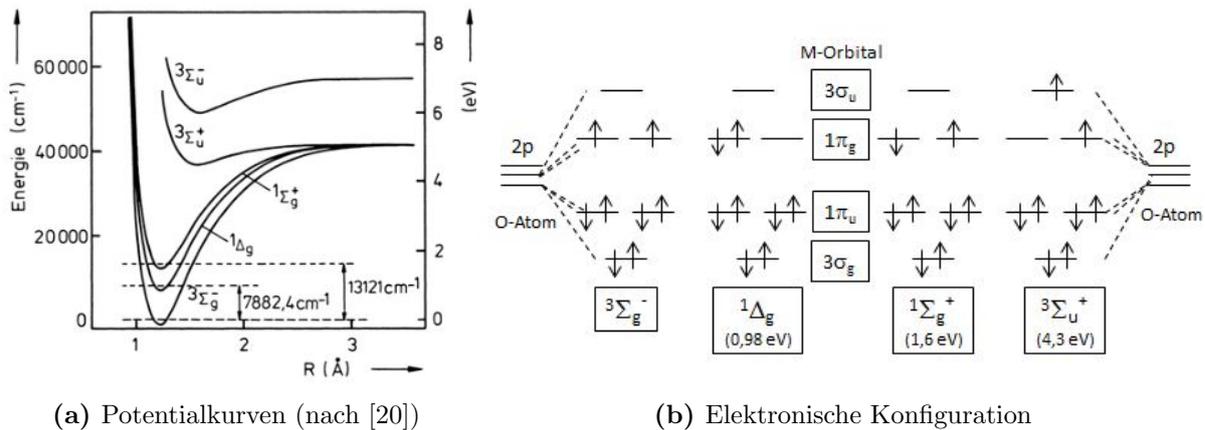


Abb. 12: Das  $O_2$ -Molekül im Grundzustand und seine ersten drei angeregten Zustände.

### 3.2.1. Elektronische Struktur

Viele der (ungewöhnlichen) Eigenschaften des  $O_2$ -Moleküls bezüglich z.B. seines magnetischen Verhaltens oder seiner geringen Reaktionsfähigkeit im Grundzustand lassen sich auf seine elektronische Struktur zurückführen.

Mit insgesamt 16 Elektronen besitzt molekularer Sauerstoff die elektronische Konfiguration  $KK-(2\sigma_g)^2(2\sigma_u)^2(3\sigma_g)^2(1\pi_u)^4(1\pi_g)^2$ . Nach Auffüllen der Molekülorbitale beim Maximieren der Gesamtspinzahlen fällt auf, dass das  $O_2$ -Molekül die Multiplizität  $M = 3$  besitzt, wodurch sich eine mit  ${}^3\Sigma_g^-$  bezeichnete Triplettkonfiguration im Grundzustand ergibt. Dies ist sehr unüblich und erklärt z.B. warum Oxidationsprozesse durch  $O_2({}^3\Sigma_g^-)$  besonders schwierig sind, denn auch für intramolekulare Prozesse muss der Gesamtspin des Systems erhalten bleiben. So müsste vor der Reaktion eine endotherme Spinumkehr stattfinden und dies erfordert eine gewisse Aktivierungsenergie.  $O_2({}^3\Sigma_g^-)$  neigt somit dazu, die Elektronen eins nach dem anderen aufzunehmen, und die Reaktion läuft wesentlich langsamer ab[29].

Abb. 12b entnimmt man die elektronische Konfiguration des Grundzustandes sowie der ersten drei angeregten Zustände vom Sauerstoff-Molekül. Hier wird ersichtlich, inwiefern die Besetzung der Molekülorbitale beim  ${}^1\Delta_g$ -Zustand die Reaktionsfähigkeit vom  $O_2$ -Molekül beeinflusst. Eines der  $1\pi_g$ -Orbitale wird nun zweifach besetzt, es gibt somit keine ungepaarte Elektronen mehr und die o.g. spin-bedingte Beschränkung bezüglich der Besetzung der Zustände wird aufgehoben.

Ähnliches beobachtet man beim nächsten angeregten Zustand  ${}^1\Sigma_g^+$ . Allerdings zerfällt dieser sehr schnell in den  ${}^1\Delta_g$ -Zustand und zwar deshalb, weil einerseits der energetische Abstand zwischen den Singulett-Zuständen nur noch  $\Delta\nu \approx 5240 \text{ cm}^{-1}$  beträgt (s. Abb 12a) andererseits weil es sich um einen Spin-erlaubten, elektrischen Quadrupolübergang handelt[31].

Typische Lebendauern  $\tau_\Sigma$  liegen im sub-ns-Bereich für nicht allzu effektive Quencher und sie beträgt sogar  $\tau_\Sigma=6,5 \text{ ps}$  in  $H_2O$ [22]. Der Vergleich mit  $\tau_\Delta \approx 3,1-3,4 \mu\text{s}$  (in  $H_2O$ ) erklärt die zu vernachlässigende Rolle, die der  ${}^1\Sigma_g^+$ -Zustand bei chemischen Reaktio-

nen spielt und betont die Sonderstellung vom  $^1\Delta_g$ -Zustand in der Diskussion über biologische Systeme.

Nachdem die Aufmerksamkeit auf diesen besonderen Zustand gerichtet wurde wollen wir uns weiterhin mit der Besetzungskinetik auseinandersetzen, welche uns den Weg zu quantitativen Aussagen ermöglichen wird.

### 3.2.2. $^1\Delta_g$ -Kinetik

Das Modell, das zur Beschreibung der photosensibilisierten Generierung und anschließenden Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff herangezogen wird, ist in [32] bereits beschrieben worden. In homogenen Systemen (z.B. in Lösemitteln) gilt, dass das  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignal der Anzahl der angeregten Moleküle proportional ist. Deshalb werden wir die kinetischen Differentialgleichungen nicht auf die Zustandsdichten, sondern direkt auf die Konzentrationen  $[^1\Delta_g]$  ( $\text{O}_2$ -Moleküle im ersten Singulett-Zustand) und  $[T_1]$  (photosensibilisierende Moleküle im  $T_1$ -Zustand) beziehen. Unter der Annahme sehr langer Phosphoreszenzlebensdauern, sind für  $[T_1]$  lediglich zwei Entleerungskanäle zu berücksichtigen:  $k_{nr}$  für die nicht-strahlenden Übergänge und  $k_{T\rightarrow\Delta}$  für den Energietransfer an ein  $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ -Molekül. Weiterhin nimmt zunächst  $[^1\Delta_g]$  mit der selben Rate  $k_{T\rightarrow\Delta}$  zu und wird hauptsächlich mit der Quenchingrate  $k_Q$  entleert (hier gelte ebenfalls  $k_{Ph,\Delta} \ll k_Q$ ). Dies führt zu folgendem stark vereinfachten Differentialgleichungssystem:

$$\frac{d}{dt}[T_1] = -(k_{nr} + k_{T\rightarrow\Delta})[T_1] \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt}[^1\Delta_g] = +k_{T\rightarrow\Delta}[T_1] - k_Q[^1\Delta_g] \quad (13)$$

welches auf eine einzige, einem gedämpften harmonischen Oszillator entsprechende DGL zweiter Ordnung zurückgeführt und durch den exponentiellen Ansatz  $[^1\Delta_g](t) \propto e^{-\kappa t}$  gelöst werden kann. Da man zwei linear unabhängige Lösungen erhält, ergibt sich die vollständige Lösung aus dem allgemeinen Ansatz:

$$[^1\Delta_g](t) = A \cdot e^{-\kappa_1 t} + B \cdot e^{-\kappa_2 t} \quad (14)$$

mit A und B, zwei noch aus den Anfangsbedingungen zu bestimmende Konstanten. Dazu setzen wir voraus, dass die Besetzung des  $T_1$ -Zustandes bei  $t=0$  abgeschlossen ist, d.h. es gibt eine Konstante  $[T_1]_0 > 0$  sodass  $[T_1](t=0) = [T_1]_0$  gilt. Desweiteren fordern wir, dass bei  $t=0$  noch kein Singulett-Sauerstoff vorhanden ist, also  $[^1\Delta_g](t=0) = A + B = 0$ .

Somit ist der zeitliche Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Konzentration durch folgenden Ausdruck bestimmt:

$$[{}^1\Delta_g](t) = \frac{k_{T \rightarrow \Delta} \cdot [T_1]_0}{\kappa_1 - \kappa_2} (e^{-\kappa_2 t} - e^{-\kappa_1 t}) \quad (15)$$

wobei  $\kappa_1^{-1} = (k_{nr} + k_{T \rightarrow \Delta})^{-1}$  die Triplett-Lebensdauer,  $\kappa_2^{-1} = k_Q^{-1}$  die durch Quenching bestimmte Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer ist. Ist nun  $\kappa_1$  eindeutig von  $\kappa_2$  zu unterscheiden und zwar  $\kappa_1 > \kappa_2$ , so ist der Anstieg des  ${}^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignals für *kleine* Zeiten  $t \ll \kappa_1^{-1}$  durch die Triplett-, der Abfall für  $t \gg \kappa_2^{-1}$  durch die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer bestimmt.

### 3.2.3. Zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff

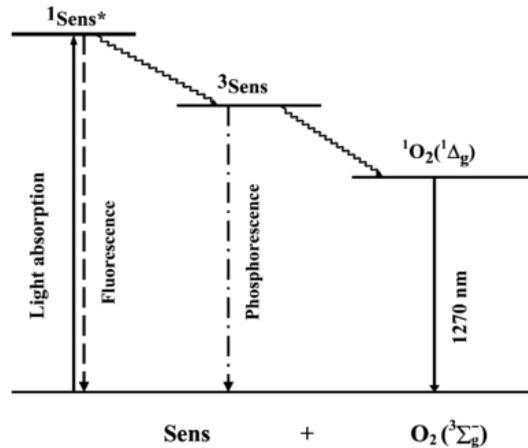
Es gibt verschiedenste Methoden, die zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff dienen. Dabei ist ein direkter Nachweis der  ${}^1\text{O}_2$ -Lumineszenz zwar bevorzugt, aufgrund des technischen Aufwands aber erst seit einigen Jahren möglich. Zuvor musste man auf biologische oder chemische, indirekte Methoden zurückgreifen.

**Indirekter Nachweis.** Eine in der Biologie übliche Methode zum Nachweis von *ROS* insbesondere von Singulett-Sauerstoff beruht auf Messungen vom Fluoreszenzsignal eines redoxsensitiven fluoreszierenden Komplexes. Ein Musterbeispiel befindet sich in [43], wo ein redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein (roGFP) verwendet wurde, um die intrazellulären Redoxbedingungen einer Probe vor und während Beleuchtung nach Zugabe von Hypericin zu untersuchen. Das roGFP fluoresziert umso stärker je höher die Konzentration von *ROS* in der Umgebung ist.

Um ein weiteres Beispiel zu nennen, besteht ebenfalls die Möglichkeit, über Elektronenspinresonanz (ESR) die Bildung von Sauerstoffradikalen nachzuweisen. In [44] wird beispielsweise der konkrete Fall behandelt, bei dem das  ${}^{14}\text{N}$  enthaltende 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (TEMP) gemäß  $\text{TEMP} + {}^1\text{O}_2 \rightarrow \text{TEMPO}$  in das langlebige Radikal TEMPO überführt wird. Somit kann man die Wechselwirkung zwischen dem N-Atom (Spin=1) und dem ungepaarten Elektron in  $-\text{O}^*$  verfolgen und auf die Menge des TYP-II-generierten Singulett-Sauerstoffs schliessen.

Bei beiden Verfahren geht man aber davon aus, dass nur  ${}^1\text{O}_2$  und sonst keine weitere *ROS* für das beobachtete Phänomen verantwortlich ist.

**Direkter Nachweis.** Der direkte Nachweis von  ${}^1\text{O}_2$  besteht darin, das Phosphoreszenzlicht des  ${}^1\Delta_g \rightarrow {}^3\Sigma_g^-$ -Überganges zu messen, welcher laut Kasha womöglich *der verbotenste* Übergang ist, den es in der Natur gibt. In der Tat ist er spin-, symmetrie- und paritätsverboten und die Deaktivierung des  ${}^1\Delta_g$ -Zustandes über Lichtemission ist in biologischen Systemen  $10^{-7}$ -fach ineffizienter als das strahlungslose Quenching [31]. Ende der 60er Jahren gelang Snelling [77] die Beobachtung der Phosphoreszenz. Dabei wurden die Sauerstoff-Moleküle in gasförmiger Phase durch Energietransfer vom Triplett-Zustand eines Benzenmoleküls angeregt (schematisch in Abb. 13). Desweiteren wurde die  $({}^1\text{O}_2)_2$ -Emission mit Peakmaximum bei  $703\text{nm}$  und schwächere Banden



**Abb. 13:** Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur photosensibilisierten Generierung von  $^1\text{O}_2$  (nach [22])

bei  $635\text{nm}$  sowie  $775\text{--}780\text{nm}$  ebenfalls nachgewiesen. Für mehr Information über Dimolumineszenz sei hier auf die entsprechende Literatur hingewiesen[22, 45].

In der AG Photobiophysik wurde im Jahr 2009 ein Messaufbau konzipiert zum zeitaufgelösten Nachweis der  $^1\text{O}_2$ –Lumineszenz[32]. Dieser verwendet als Detektor ein PMT (PMT: *Photomultiplier Tube*), dessen Signal mittels zeitkorrelierter Multiphotonenzählung (TCMPC) ausgewertet wird. Somit sinken rauschbedingte Einflüsse dramatisch ab, weshalb die Messanlage eine aussergewöhnliche Empfindlichkeit besitzt.

### 3.3. Der ideale Photosensibilisator

Wenn auch beliebt aufgrund der wenigen toxischen Nebenwirkungen im Vergleich zu anderen Behandlungsmethoden, bringt die PDT auch neue Fragen mit sich. Der PDT Agent Photofrin<sup>®</sup> kann z.B. bis zu sechs, Sn-Etiopurpurin bis zu vier Wochen im Körper des Patienten verbleiben, sodass jener während dieser Zeit weiterhin lichtempfindlich ist[37, 46]. Ein weiterer Nachteil von Photofrin<sup>®</sup> betrifft seine optischen Eigenschaften: die längste Wellenlänge, bei der es absorptionsfähig ist liegt bei  $630\text{nm}$  und somit noch nicht ganz im photodynamischen Fenster von  $650\text{--}850\text{nm}$ . Die Eindringtiefe des Lichtes ist bei dieser Wellenlänge durch die im Blut zahlreich vorhandenen Chromophore (z.B. Hämoglobin) aber auch durch Streuung stark beschränkt.

Diese Überlegungen zusammen mit der Diskussion über Photosensibilisierung können als Grundlage angesehen werden für die Optimierung der Eigenschaften von neuen, zur zweiten (und dritten) Generation gehörenden Photosensibilisatoren. Als *ideal* wird also jener PDT-Agent bezeichnet, der folgende Eigenschaften besitzt:

- starke Extinktion im sog. photodynamischen Fenster:  $650\text{--}850\text{nm}$
- hohe ISC–Quantenausbeute mit Triplettenergien  $E(^3\text{PS}) > 94\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
- hohe  $^1\Delta_g$ –Quantenausbeuten

- hohe Photostabilität (wenig anfällig zur Dissoziation)
- verschwindend geringe Dunkeltoxizität
- effizientes Targeting
- möglichst degradierbar für den Körper
- nicht allzu aufwendige chemische Herstellung

Jetzt wissen wir welche Eigenschaften in den Vordergrund gestellt werden sollen, wenn ein Photosensibilisator in der PDT Anwendung finden soll. In den kommenden Abschnitten machen wir uns auf die Suche nach solchen Eigenschaften.

## 4. Materialien und Messmethoden

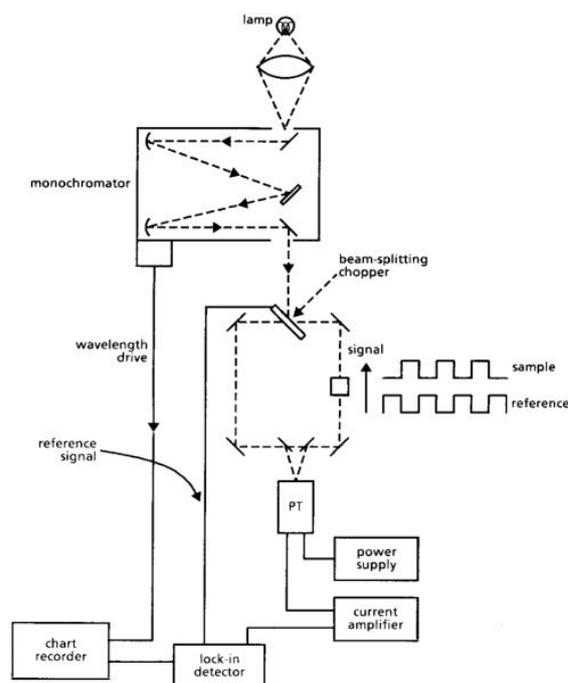
Zur photophysikalischen Charakterisierung der Photosensibilisatoren wurden Messungen zur stationären Absorption, stationären sowie zeitaufgelösten Fluoreszenz, ps-Transientenabsorption und photosensibilisierten  $^1O_2$ -Generierung durchgeführt, weshalb wir auf diese Messmethoden einzeln eingehen werden. Die untersuchten Verbindungen werden zum Schluss dargestellt.

### 4.1. Stationäre Absorptionsspektroskopie

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie lassen sich UV-VIS-Absorptionsspektren der untersuchten Verbindungen aufnehmen, aus denen man folgende grundlegende Informationen erhalten kann: Intensität sowie spektrale Lage und Form der Absorptionsbanden.

Zur Messung von Absorptionsbanden stand ein Shimadzu<sup>®</sup> Spektrophotometer UV-160A zur Verfügung, das in der Zweistrahlkonfiguration arbeitet (siehe Abb. 14). Als Lichtquellen dienen eine Deuterium- sowie eine Halogenlampe. Mittels eines Monochromators kann die Wellenlänge zwischen 200 und 1100 nm durchgeföhren werden (Fehler der Wellenlängen-Kalibrierung:  $\pm 0,5\text{nm}$ ). Es wird ein 3-mm breiter Lichtstrahl erzeugt, der durch einen Chopper abwechselnd zur Probe bzw. zur Referenz geschickt wird. Eine einfache Photodiode detektiert schließlich die Signale.

Bei einer optischen Dichte von  $OD=1$  ist von einem Fehler von  $\pm 0,5\%$  auszugehen. Die Messwerte können bis auf  $\pm 0,2\%$  Abweichung reproduziert werden.



**Abb. 14:** Prinzipieller Aufbau eines Spektrophotometers in Zweistrahlkonfiguration (nach [1])

**Bestimmung von Extinktionskoeffizienten** Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon(\lambda)$  wurden für jede Verbindung eine Stammlösung der Ausgangskonzentration  $c_0$  in 25ml Meßkolben und anschließend Verdünnungsreihen mit den Konzentrationsverhältnissen 1:6, 1:9, 1:11 sowie 1:15 hergestellt. Grundlage für diese Untersuchungen ist Gl. (1), wonach die OD sich linear mit der Konzentration der Lösung ändert. Mißt man also die OD bei unterschiedlichen (bekannten) Konzentrationen, so kann man den Extinktionskoeffizient bestimmen.

In Tabelle 1 befinden sich die Ausgangskonzentration  $c_0$  für jede Verbindung sowie ihre molare Masse  $M_{mol}$ .

Verbindung	$M_{mol} [g \cdot mol^{-1}]$	$c_0 [mM]$
C-2	676,80	0,183
C-5	676,80	0,077
C-6	660,80	0,133
BC-2	738,87	0,070
BC-4	736,86	0,022
BC-5	770,87	0,052
BC-6	710,82	0,107

**Tabelle 1:** Ausgangskonzentrationen bei der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

## 4.2. Stationäre Fluoreszenzspektroskopie

Unmittelbar nach Anregung ist davon auszugehen, dass sich die untersuchten Verbindungen im  $S_1$ -Zustand befinden. Aus diesem Zustand können jene u.a. strahlend relaxieren, sodass sie nach Emission eines molekülspezifischen, von der Anregungswellenlänge unabhängigen Fluoreszenzspektrums in den Grundzustand übergehen (s. Abschnitt 2.1.3). Solche Spektren konnten mit einem einfachen Messplatz aufgenommen werden, der in Abb. 15 schematisch dargestellt ist.

### 4.2.1. Messaufbau

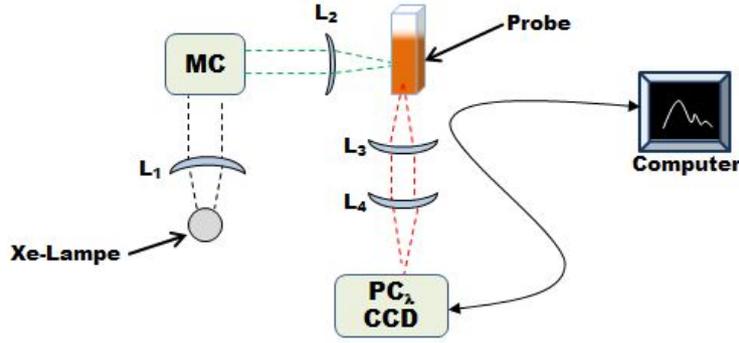
Die Anregung erfolgt durch eine an einen Monochromator (Oriel, 77250) angeschlossene Xe-Lampe (XBO 150, OSRAM), welche Anregungswellenlängen im Bereich 300-900 nm ermöglicht. Die Bandbreite des ausgewählten Anregungspulses beträgt etwa  $\Delta\lambda \approx 10$  nm. Das Emissionslicht wird nach Durchlaufen eines Polychromators (Oriel, Multispec, 77400) und orthogonal zur Anregung von einem gekühlten CCD-Sensor (LotOriel, Instaspec IV, 77131) detektiert. Es ist mit einem Fehler von etwa  $\Delta\lambda \approx 1$  nm in der spektralen Lage des Peaks zu rechnen.

### 4.2.2. Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{Fl}$

Ein wichtiger Parameter, der mit diesem Messplatz bestimmt werden soll ist die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{Fl}$ , welche als Verhältnis zwischen den emittierten Photonen  $n_e$  zu den von der selben Verbindung absorbierten Photonen  $n_a$  definiert ist. Da man aber Intensitäten misst, muss diese Definition mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes (Gl. 1) umgeschrieben werden:

$$\Phi_{Fl,B} = \frac{n_e}{n_a} = \frac{I_{Fl,B}}{I_0 - I(l)} \quad (16)$$

wobei  $I_{Fl,B}$  das integrierte Fluoreszenzspektrum der untersuchten Verbindung  $B$  (z.B. eines Bacteriochlorins) ist. Durch geeignete Kombination von Gl. (1) und (16) lässt



**Abb. 15:** Schematischer Aufbau des verwendeten Fluoreszenzmessplatzes. Das Anregungslicht wird durch eine Xe-Lampe erzeugt, die Wellenlänge durch einen Monochromator (MC) ausgewählt. Das Fluoreszenzlicht trifft dann unter einem Winkel von  $90^\circ$  bezüglich der Anregung auf einen Polychromator (PC). Ein CCD-Element detektiert das Signal und schickt dieses an einen Computer weiter.

sich  $I_{Fl,B}$  schreiben als:

$$I_{Fl,B} = I_0(1 - 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l}) \cdot \Phi_{Fl,B} \quad (17)$$

Findet man nun eine Referenzverbindung mit bekannter Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{Fl,B}$ , so führt ein Quotientenvergleich zu der Gleichung:

$$\Phi_{Fl,B} = \frac{I_{Fl,B}}{I_{Fl,Ref}} \cdot \frac{1 - 10^{-OD_{Ref}}}{1 - 10^{-OD_B}} \cdot \Phi_{Fl,Ref} \quad (18)$$

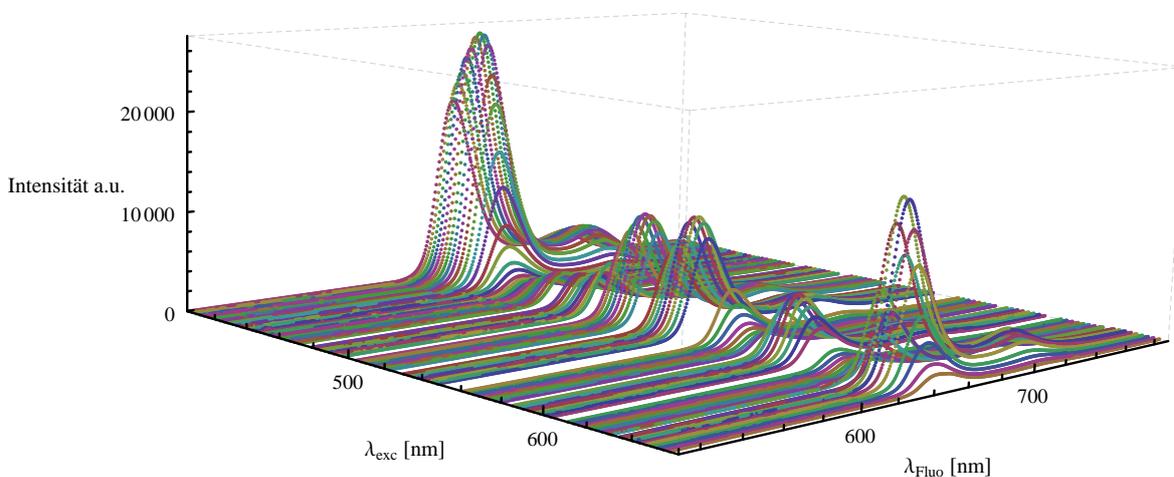
Zur Berechnung von  $\Phi_{Fl}$  muss die optische Dichte der Referenz  $OD_{Ref}$  sowie der untersuchten Verbindung  $OD_B$  bekannt sein. Diese wurden auf etwa 0,1 eingestellt, um Reabsorptionseffekte zu vermeiden. Durch die endliche Bandbreite des Anregungspulses kommt es zu leicht unterschiedlichen OD-Werten. Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurden sämtliche Fluoreszenzspektren bei sieben verschiedenen Anregungswellenlängen aufgenommen und Mittelwerte gebildet. Nach einer letzten Korrektur, die vorgenommen werden muss, wenn sich die Substanz B im Lösungsmittel  $n_B$ , die Referenz aber in jenem mit  $n_{Ref}$  befindet, ändert sich Gl. (18) folgendermaßen[2]:

$$\Phi_{Fl,B} = \frac{I_{Fl,B}}{I_{Fl,Ref}} \cdot \frac{1 - 10^{-OD_{Ref}}}{1 - 10^{-OD_B}} \cdot \left( \frac{n_B}{n_{Ref}} \right)^2 \cdot \Phi_{Fl,Ref} \quad (19)$$

### 4.2.3. Anregungsspektroskopie

Nimmt man nun für mehrere Anregungswellenlängen  $\lambda_{exc}$  die Fluoreszenzspektren auf, so kann man sog. Anregungsspektren erstellen, d.h. bei fest gehaltener Beobachtungswellenlänge, integrierte Fluoreszenzsignale, die gegen  $\lambda_{exc}$  aufgetragen wurden. Befindet sich in der Lösung ein einziger Fluorophor, so entspricht das Anregungs- dem Absorptionsspektrum des Moleküls[66]. Ändert sich dagegen die Form des Anregungsspektrums mit  $\lambda_{exc}$ , so besteht ein Hinweis auf mehrere Komponenten, die selektiv angeregt werden. Dies können Aggregate oder auch Verunreinigungen sein.

Da die Anzahl an aufgenommenen Fluoreszenzspektren systematisch über 100 beträgt, wurde der Monochromator mit einer Motorsteuerung versehen, sodass man ein Anregungsintervall sowie die Schrittweite  $\Delta\lambda$  angeben und die automatisierte Messung laufen lassen kann. Bei der Verarbeitung der Daten ist es wichtig, eine Detektor- sowie eine Lampenkorrekturkurve zu berücksichtigen. Die erste trägt der sich mit der Wellenlänge ändernden Detektorempfindlichkeit, die zweite dem Emissionsspektrum der Xe-Lampe Rechnung. Für die Auswertung der Spektren war es notwendig ein Skript in Mathematica<sup>®</sup> zu schreiben, welches sämtliche Daten einliest, verarbeitet und graphisch darstellt (Quelltext im Anhang B). Das Skript erlaubt wahlweise eine zweidimensionale graphische Darstellung, über die man das Absorptionsspektrum zum schnellen Vergleich plotten kann oder aber auch eine dreidimensionale Darstellung (Abb. 16), in der man die Formänderungen des Anregungs- bezüglich des Absorptionsspektrums besser erkennen und auflösen kann.



**Abb. 16:** 3D-Darstellung des Anregungsspektrums von C-2: Schnitte längs der  $\lambda_{Fluo}$ -Achse ergeben das stationäre Fluoreszenzsignal während Schnitte längs der  $\lambda_{exc}$ -Achse dem Absorptionsspektrum überlagert werden können. Die entsprechende 2D-Darstellung ist in Abb. 30a zu sehen.

### 4.3. Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Wie sich die Fluoreszenz eines gegebenen Fluorophores zeitlich verhält kann man dank der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC: *time-correlated single photon counting*) untersuchen. Zunächst wird das Prinzip der TCSPC erklärt und der verwendete Messplatz beschrieben. Anschließend wird kurz auf zerfallsassozierte Spektren eingegangen (DAFS: *decay-associated fluorescence spectroscopy*).

#### 4.3.1. Grundlage zur TCSPC

Die Methode der Einzelphotonenzählung beruht auf der Annahme, dass man von der Wahrscheinlichkeitsverteilung *einzelner* detektierter, zeitkorrelierter Photonen ausgehend das zeitliche Verhalten der Intensität *aller* emittierten Photonen nach Anregung rekonstruieren kann. Man misst also die Einzelphotonemission der Probe für eine große Anzahl von hintereinander folgenden Anregungspulsen, trägt jeweils den Zeitunterschied zwischen Anregung und Ankunft des emittierten Photons in ein Histogramm ein und erhält somit eine sich über die Zeit erstreckende Verteilung, welche man im Anschluss mit einem passenden theoretischen Ansatz vergleichen kann. Dieses Messprinzip funktioniert jedoch nur dann, wenn die Wahrscheinlichkeit dafür, dass mehr als ein Photon pro Anregungspuls detektiert wird, verschwindend gering ist. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so kommt es zum sog. *pile-up* Effekt[66]. Es gibt also in der Tat mehrere Anregungszyklen, bei denen man kein Photon detektiert. Wird hingegen ein Photon detektiert (dies geschieht in 5-10% der Anregungszyklen), so wird die Zeit zwischen Puls und Eintreffen des Photons gespeichert. Das untere Balkendiagramm in Abb. 17 ergibt sich dann, wenn man insgesamt viele Photonen gezählt und ihre Häufigkeit in den jeweiligen Zeitkanälen eingetragen hat. Man nimmt nun abhängig von der Probe einen mono- bzw. multiexponentiellen Zerfall der Fluoreszenz an. Sind  $\tau_i$  und  $A_i$  jeweils die Fluoreszenzlebensdauern und die Amplitude der  $i$ -ten Komponente des Fluoreszenzsignals, so beschreibt:

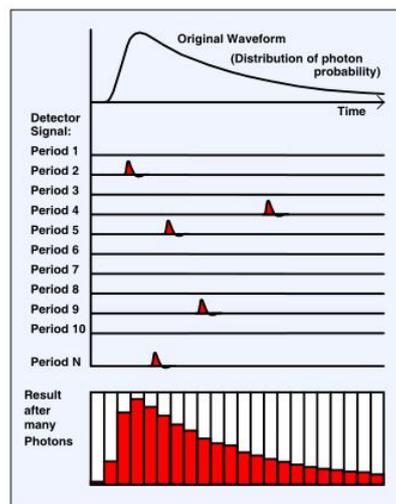


Abb. 17: Messprinzip der Einzelphotonenzählung (nach [3])

$$I(t) = \sum_{i=0}^k A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (20)$$

die Fluoreszenzintensität  $I(t)$  zum Zeitpunkt  $t$ .

Zusätzlich muss noch der Tatsache Rechnung getragen werden, dass weder der Anregungspuls unendlich schmal (Pulsbreite beträgt  $13ps$ ) noch die Antwort des Messsy-

stems unendlich schnell ist. Somit zerfällt bereits ein gewisser Anteil der durch die *schnelleren* Photonen angeregten Moleküle während manche durch die Photonen am Pulsausläufer erst angeregt werden.

Man gehe davon aus, dass der Anregungspuls eine Summe von  $\delta$ -Peaks mit Amplitude  $P(t')$  zur Zeit  $t'$  ist. Die Anzahl der zum Zeitpunkt  $t'$  angeregten Moleküle  $[M^*](t')$  ist notwendigerweise proportional zur Amplitude  $P(t')$ . Somit ergibt sich für die Anzahl der zum späteren Zeitpunkt  $t-t'$  noch angeregten Moleküle folgende Proportionalitätsbeziehung:  $[M^*](t-t') \propto P(t') \cdot I(t-t')$ . Nun lässt sich die Gesamtzahl an angeregten Molekülen zum Zeitpunkt  $t$ , als Summe über alle frühere ( $t' < t$ ) Zeiten  $t'$  berechnen:

$$[M^*](t) \propto \sum_0^t P(t') \cdot I(t-t') \quad (21)$$

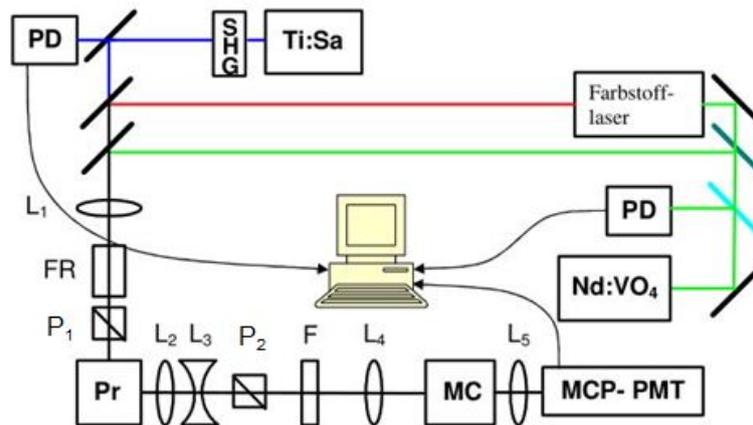
wobei  $[M^*](t)$  für niedrige Konzentrationen wiederum zur Intensität proportional ist. Im Allgemeinen sollte man sich darüber bewusst sein, dass das gemessene Signal  $J(t)$  immer eine Faltung zwischen der Apparatefunktion  $P(t')$  und dem eigentlichen Signal ist, welches die mathematisch korrekte Form[5]:

$$J(t) = \int_0^t P(t') \cdot I(t-t') dt \quad (22)$$

annimmt. Die Anpassung der Messdaten an Gl. (22) erfolgte mit Hilfe des in der Arbeitsgruppe entwickelten Programms *vfit*.

#### 4.3.2. Experimentelle Anordnung

Der in der AG Photobiophysik verwendete Messplatz ist in [4] ausführlich beschrieben und in Abb. 18 schematisch dargestellt.



**Abb. 18:** Schematischer Aufbau des verwendeten TCSPC-Messplatzes: Ti:Sa: Titan-Saphir-Laser (120fs, 800nm), Nd:VO<sub>4</sub>: gepulster Laser (13ps, 532nm), Farbstofflaser: Synchron gepumpt, Farbstoff: DCM (610-670nm) SHG: Second-Harmonic-Generator. Ausführlichere Beschreibung, siehe Text (nach [4])

Im Wesentlichen läuft die Messung folgendermaßen ab: über eine Photodiode (PD) wird von der Lichtquelle ein SYNC-Signal erzeugt, welches mit dem optischen Anregungspuls zeitkorreliert ist. Ein CFD (CFD: *constant fraction discriminator*) leitet das Signal weiter zum TAC (TAC: *time-to-amplitude converter*), der die Aufladung eines Kondensators auslöst. Andererseits, trifft das Anregungslicht auf einen Fresnel-Rhombus (FR), wo man seine Intensität regeln kann. An dieser Stelle wird die o.g. Bedingung erfüllt, dass bei höchstens jedem hundertsten Laserpuls ein Photon detektiert wird.

Das durch einen Polarisator (P1) polarisierte Laserlicht wird dann über einen 90°-Spiegel in die sich oberhalb des Tisches befindende Probe (Pr) gelenkt. Das emittierte Fluoreszenzlicht trifft zunächst einmal auf einen Polarisator (P2), dessen Polarisationsachse sich stufenlos einstellen lässt. Für die in dieser Arbeit relevanten Untersuchungen war es notwendig, in der Position des magischen Winkels (54,7°) zu messen, um von Rotationseffekten unabhängige Signale zu erhalten[66]. Anschließend wird das Streulicht mit Hilfe eines Filters (F) entfernt, die Beobachtungswellenlänge am MC gewählt und die Photonen von einem thermoelektrisch gekühlten Mikrokanalplatten-Photomultiplier (MCP-PMT) detektiert. Üblicherweise stoppt das hieraus resultierende Signal das Aufladen des Kondensators im TAC, welcher ein Signal erzeugt, dessen Amplitude dem erreichten Spannungswert im Kondensator und somit dem Zeitunterschied zwischen START- und STOP-Puls proportional ist. Diese Anlage funktioniert jedoch im *reversed modus*, d.h. das einfallende Photon startet den TAC und der Synchronisationspuls dient als STOP-Puls.

#### 4.3.3. DAFS

Bei zerfallsassoziierten Spektren führt man 50 bis 100 TCSPC-Messungen durch, wobei man ausschließlich die Detektionswellenlänge am MC ändert. Liegen mehrere fluoreszierende Spezies (aber auch Verunreinigungen) mit sich ausreichend unterscheidenden Fluoreszenzlebensdauern vor, so kann das gesamte Spektrum gemäss Gl. (20) ausgewertet und mit entsprechenden wellenlängenabhängigen Amplituden  $A_i(\lambda)$  zerlegt werden. Liegt hingegen ein einzelner Fluorophor vor, so ist es zu erwarten, dass das DAFS-Spektrum exakt mit dem aus der stationären Fluoreszenz gewonnenen Spektrum übereinstimmt.

Bei selektiver Anregung komplexer Moleküle können mittels DAFS Energie- oder auch Elektronentransferprozesse in hervorragender Weise untersucht werden. Ein besonders interessantes Beispiel hierzu findet der Leser in [15].

#### 4.4. ps-TAS

Mit Hilfe der ps-TAS können Aussagen über die Kinetik der Deaktivierung der untersuchten Moleküle nach Anregung als auch über den strahlungslosen Übergang zwischen Singulett- und Triplett-Zustand getroffen werden. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der Interkombinationsquantenausbeute  $\Phi_{ISC}$ . Es wird zunächst auf das Messprinzip kurz eingegangen, danach wird die Messanlage beschrieben.

#### 4.4.1. Messprinzip

Bei der TAS handelt es sich um ein Pump-Probe-Verfahren (s. Abb. 19), d.h. die Probe wird zunächst durch einen starken Pumpimpuls angeregt und mit Hilfe eines um  $\Delta t$  zeitverzögerten Testpulses untersucht. Gemessen wird die Änderung des Absorptionsvermögens der Probe bei unterschiedlichen  $\Delta t$  zwischen Pump- und Testpuls.

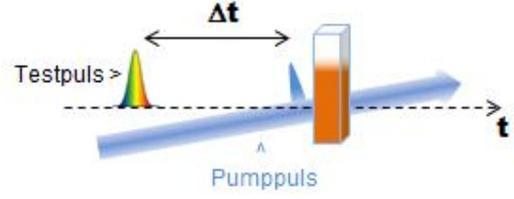


Abb. 19: Zum Pump-Probe-Verfahren

Als Meßgröße dient die Änderung der optischen Dichte  $\Delta OD(\lambda, t)$ :

$$\Delta OD(\lambda, t) = OD^*(\lambda, t) - OD(\lambda, t = 0) = \log_{10} \frac{T^*(\lambda, t)}{T(\lambda, t = 0)} \quad (23)$$

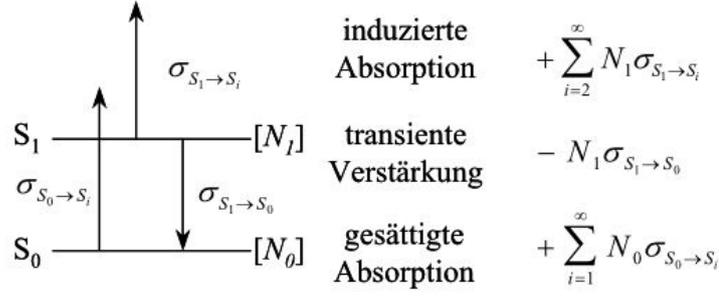
wobei  $T^*(\lambda, t)$  die Transmission der angeregten Probe im Zeitpunkt  $t$ ,  $T(\lambda, t = 0)$  jene der nicht angeregten Probe ist. Unmittelbar nach Anregung verbleibt nur ein Teil der Moleküle im Grundzustand. Mit Hilfe des zeitverzögerten Testpulses wird die Besetzungskinetik angeregter Zustände untersucht. Insbesondere interessiert man sich oft für den stark vereinfachten Fall, wo nur der erste angeregte Singulett-Zustand  $S_1$  bevölkert wird. In diesem Falle setzt sich das  $\Delta OD$ -Signal aus nur drei Transienten zusammen (s. Abb. 20). Die sich im  $S_0$ -Zustand befindenden Moleküle liefern den als gesättigte Grundzustandsabsorption bekannten Beitrag. Moleküle, welche in den  $S_1$ -Zustand angeregt wurden, können weiterhin in höhere  $S_n$ -Zustände angehoben werden und sind für die sog. induzierte Absorption zuständig. Den dritten Beitrag ergibt die stimulierte Emission der sich im  $S_1$ -Zustand befindenden Moleküle. Dies nennt man transiente Verstärkung.

Nun wollen wir die Form des erhaltenen Signals formell schreiben. Hierfür brauchen wir lediglich die vorigen Überlegungen mit Hilfe von Gl. (3) umzuschreiben. Die optische Dichte der angeregten Probe lautet:

$$OD^*(\lambda, t) = \frac{l}{\ln 10} \left( \sum_{i=1}^{\infty} \mathbf{N}_0(t) \cdot \sigma_{S_0 \rightarrow S_1}(\lambda) + \sum_{i=2}^{\infty} \mathbf{N}_1(t) \cdot \sigma_{S_1 \rightarrow S_i}(\lambda) - \mathbf{N}_1(t) \cdot \sigma_{S_1 \rightarrow S_0}(\lambda) \right) \quad (24)$$

Kombiniert man jetzt Gln. (23) und (24) unter Berücksichtigung der o.g. Einschränkung, dass die Moleküle, die sich nicht mehr im Grundzustand befinden ausschließlich das erste Singulett-Niveau bevölkern, d.h. es gelte:  $\mathbf{N}_1(t) = \mathbf{N}_0(0) - \mathbf{N}_0(t)$ , so erhält man den expliziten Ausdruck für  $\Delta OD$ :

$$\Delta OD(\lambda, t) = \frac{l}{\ln 10} \mathbf{N}_1(t) \left( \sum_{i=2}^{\infty} \sigma_{S_1 \rightarrow S_i}(\lambda) - \sigma_{S_1 \rightarrow S_0}(\lambda) - \sum_{i=1}^{\infty} \sigma_{S_0 \rightarrow S_1}(\lambda) \right) \quad (25)$$



**Abb. 20:** Die drei Transienten eines Zwei-Niveau-Systems: nach Anregung sind ausschließlich die  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustände teilweise besetzt. Es kommt zur gesättigten Grundzustandsabsorption vom  $S_0$ -Zustand aus. Die induzierte Absorption sowie die transiente Verstärkung kommen durch die Besetzung vom  $S_1$ -Niveau zustande.

In den großen Klammern liest man nun den Ausdruck für die drei Transienten. Gl. (25) lässt sich jetzt zusammenfassen:

$$\Delta OD(\lambda, t) = \frac{l}{\ln 10} \mathbf{N}_1(t) (\sigma_{iA}(\lambda) - \sigma_{tV}(\lambda) - \sigma_{GA}(\lambda)) \quad (26)$$

indem man den Absorptionsquerschnitt des angeregten Zustands  $\sigma_{iA}(\lambda)$ , den Emissionsquerschnitt der transienten Verstärkung  $\sigma_{tV}(\lambda)$  und den Absorptionsquerschnitt des Grundzustands  $\sigma_{GA}(\lambda)$  einführt.

#### 4.4.2. Zur Bestimmung der Interkombinationsquantenausbeute $\Phi_{ISC}$

In einem 3-Niveau-Schema ( $S_0, S_1, T_1$ ) dient Gl. (26) als Ausgangspunkt für die Aufstellung eines linearen DGL-Systems, mit welchem man Rückschlüsse auf die Entleerungskinetik des  $S_1$ -Niveaus ziehen kann[6].

Eine besonders einfache Lösung erhält man wenn man berücksichtigt, dass das  $T_1$ - viel länger lebt als das  $S_1$ -Niveau und somit sich das zeitliche Verhalten der  $S_1$ -Entleerung allein mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl}$  beschreiben lässt. Auf der Zeitskala der Fluoreszenz kann man nun annehmen, dass der exponentielle Abfall nicht gegen Null sondern gegen einen konstanten Wert  $\zeta_{\infty}$  tendiert:

$$\mathbf{N}_1(t) = \zeta_0 \cdot e^{-t/\tau_{Fl}} + \zeta_{\infty} \quad (27)$$

Somit lässt sich  $\Phi_{ISC}$  als einfacher Quotient angeben:

$$\Phi_{ISC} = \frac{\zeta_{\infty}}{\zeta_{\infty} + \zeta_0} \quad (28)$$

#### 4.4.3. Experimentelle Anordnung

Der experimentelle Aufbau ist in Abb. 21 skizziert. Eine detaillierte Beschreibung findet der Leser in [6]. Den Anregungspuls erzeugt der durch die THG des Nd:YAG ps-Lasers (EKSPLA, PL2143) gepumpter OPA (EKSPLA, PG401). Alternativ kann die SHG

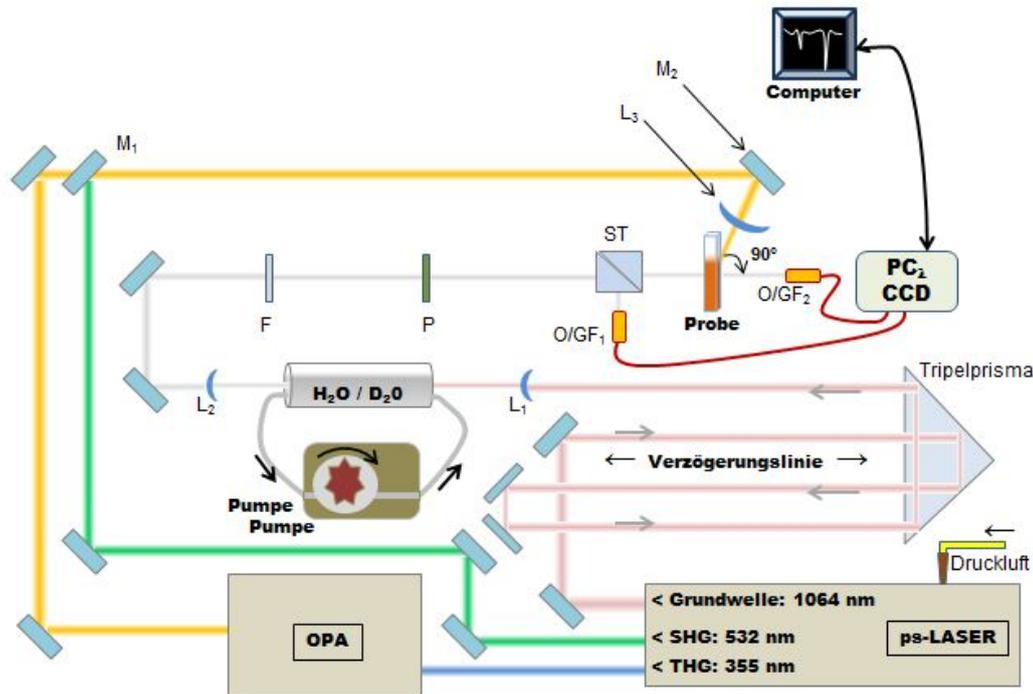


Abb. 21: Schematischer Aufbau der ps-TAS Messanlage

des Lasers mit  $M_1$  in den Strahlengang eingekoppelt werden. Feinjustage erfolgt durch Drehen von  $M_2$ .

Die Grundwelle ( $\lambda = 1,064 \mu\text{m}$ ) wird nach Durchlaufen einer Verzögerungsstufe zur Erzeugung des Weisslichtkontinuums mittels eines  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Gemisches verwendet. Ein Kantenfilter  $F$  blendet den Infrarotanteil aus. Der Polarisator ist auf die Position des *magischen Winkels* eingestellt, um Anisotropie-Effekte zu vermeiden. Dank des Strahlteilers (ST) kann ein Referenzspektrum aufgenommen werden. Die Signale werden durch Okulare in Glasfasern eingekoppelt (O/GF) und zum Polychromator weitergeleitet. Eine CCD-Matrix bildet die Spektren ab; schließlich werden die Daten an einen PC übertragen.

## 4.5. $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzmessung

Zum direkten Nachweis von  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz wurde der im Rahmen der Diplomarbeit[32] von Dipl. Phys. Jan Schlothauer konzipierten Messaufbau verwendet. Zunächst folgt eine kurze Beschreibung des Messplatzes, sowie dessen Erweiterung, bei der man LEDs als Anregungsquellen benutzt.

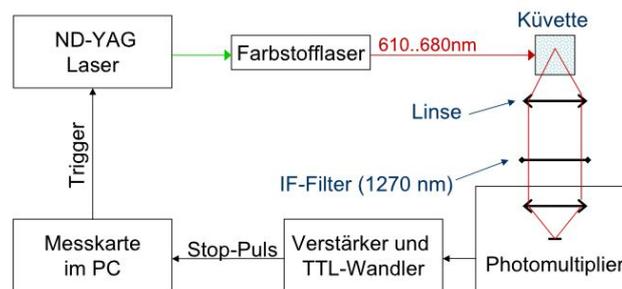
### 4.5.1. Messaufbau

Die zeitaufgelöste Messung der  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz basiert auf einer modifizierten TCSPC-Technik (siehe Abschnitt 4.3.1) insofern, dass bei der TCMPC *alle* Photonen gezählt werden und nicht nur das erste. Das zu messende Signal wird senkrecht zur Anregung

gemessen. Eine Sammellinse wird so platziert, dass ihr Brennpunkt im Anregungsvolumen liegt. Das Phosphoreszenzlicht wird hierdurch kollimiert. Weiterhin wurde ein IR-Filter mit einer Zentralwellenlänge von 1270nm (Halbwertsbreite 30nm) und Transmission von etwa 80% verwendet. Eine fest im PMT (Hamamatsu, H-10330-45) eingebaute Linse bündelt das eintreffende Licht auf die Detektorfläche. Die Anstiegszeit des PMT beträgt 900ps, die Streuung der Durchlaufzeit 300ps und seine Quanteneffizienz 2%. Die PMT-Pulse müssen noch verstärkt und in TTL-Pulse umgewandelt werden damit die TCMPC-Karte sie weiter verarbeiten kann (siehe Abb. 22). Diese dient ebenfalls zum Triggern der Anregungsquelle.

#### 4.5.2. Anregung durch Laser-Licht

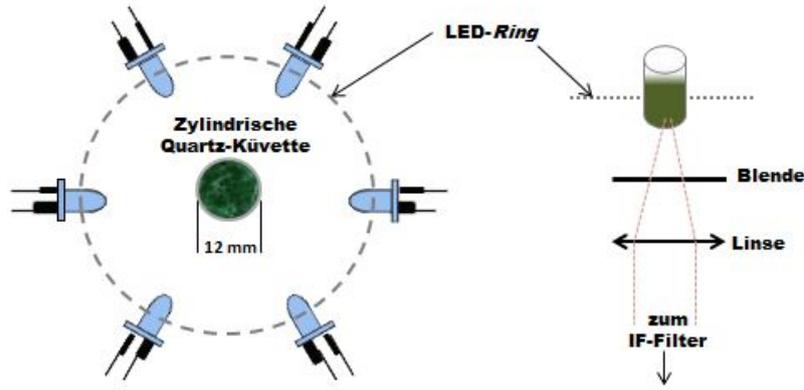
Als Anregungsquelle kann ein selbstgebauter Farbstofflaser (Farbstoff: DCM) verwendet werden, der Anregungswellenlängen von 610-680nm ermöglicht. Dieser wird von einem frequenzverdoppelten,  $\text{Nd}^{3+}$ -YAG Laser (B.M. Industries, Serie 600) gepumpt und hat demgegenüber den Vorteil, dass seine Halbwertsbreite nur die Hälfte beträgt, nämlich 60ns. Somit vermeidet man, dass Intensitätsausläufer (wenn auch sehr klein) sich mit dem zu detektierenden Signal überlappen.



**Abb. 22:** Schematischer Aufbau des Messplatzes zur Detektion von  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz (nach [32])

#### 4.5.3. Anregung durch LED-Licht

Alternativ zum Laser können LEDs zur Anregung von  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignalen eingesetzt werden. Abb. 23 zeigt die konzentrische Anordnung der LEDs um eine zylinderförmige Küvette herum. Das Phosphoreszenzlicht wird von unten detektiert. Hauptunterschiede zum in Abb. 22 dargestellten Messaufbau sind eine speziell für die LEDs konzipierte Blende, die das Licht nur dann durchlässt, wenn der LED-Kopf richtig sitzt und messbereit ist (Schutzfunktion für den Detektor) sowie der Abstand, in dem sich nun die Sammellinse befindet. Dieser beträgt nun 12 mm (statt 40 mm) und verdoppelt somit die Photonenausbeute[34]. Dank dieser Anordnung können verschiedene Anregungswellenlängen ( $\lambda_{exc} = 402, 425, 459, 486, 501, 597, 638$  und  $656\text{nm}$ ) gewählt werden.



**Abb. 23:** Schematischer Aufbau der LED-Köpfe beim Singulett-Sauerstoff-Messplatz. *Links:* Konzentrische Anordnung der LEDs um eine zylinderförmige Quarz-Küvette mit einem äußeren Durchmesser von 12mm (von oben gesehen). *Rechts:* Unterhalb der Küvette befindet sich nun eine Blende, die den Detektor schützt. Das Signal trifft bei offener Blende auf die kollimierende Linse (Abstand: 12mm) und geht wie in Abb. 22 weiter.

#### 4.5.4. Zur Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute $\Phi_{\Delta}$

Gemäss der in Gl. (16) angegebenen Definition einer Quantenausbeute fragen wir nun nach der Anzahl der emittierten Phosphoreszenzquanten bei einer gegebenen Anzahl von durch den Photosensibilisator absorbierten Anregungsquanten.

Anders als in Abschnitt 4.2.2 müssen wir bei der Bestimmung von  $\Phi_{\Delta}$  zuerst die zeitaufgelösten Signale von Referenz und Probe nach Gl. (15) fitten. Hier spielen die Ratenkonstanten auch im Vorfaktor (nicht nur im Exponenten) eine wichtige Rolle. Deshalb wird zunächst eine von den Ratenkonstanten unabhängige Amplitude  $G^{fit}$  definiert, die ausschließlich zum Fitten der Daten dient. Wurden die Ratenkonstanten bestimmt, so kann der Ausdruck für die korrigierte Amplitude des Probensignals  $G(\kappa_1, \kappa_2)$  unter der Annahme einer hohen Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute ( $\kappa_1 \approx k_{T \rightarrow \Delta}$ ) angegeben werden:

$$G = \left( \frac{1}{1 - \frac{k_Q}{k_{T \rightarrow \Delta}}} \right) \cdot G^{fit} \quad (29)$$

Weiterhin ergibt das Verhältnis der beiden (*B*:Probe; *Ref*:Referenz) korrigierten Amplituden:

$$\gamma = \frac{G_B}{G_{Ref}} \quad (30)$$

die Proportionalitätskonstante  $\gamma$  zwischen der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute der Referenz und der der untersuchten Verbindung:

$$\Phi_{\Delta,B} = \gamma \cdot \Phi_{\Delta,Ref} \quad (31)$$

Zu beachten ist noch die Tatsache, dass es wesentlich schwieriger ist eine simple *Lösungsmittelkorrektur* wie in Gl. (19) für  $\Phi_{\Delta}$  vorzunehmen, denn es käme dabei nicht nur auf die unterschiedliche Brechung, sondern auch auf zusätzliche Quenchingkonstanten an, welche für weitere Fehlerquellen sorgen und die Rechnung erschweren. Deshalb sollen Referenz und Probe bei der Bestimmung von  $\Phi_{\Delta}$  stets im selben Lösungsmittel angelöst werden. Das Fitten der Daten erfolgte mit der von M. Sc. Tobias Bornhütter entwickelten Software *SiSaFit*.

## 4.6. Laser Flash Photolyse

Aus Gl. (15) folgt, dass sich zwei  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignale für den Fall  $\kappa_1 \approx \kappa_2$  nicht mehr eindeutig unterscheiden lassen. Ob nun die Triplet-Lebensdauer den Anstieg oder den Abfall der erhaltenen Kurve bestimmt, kann man ohne zusätzliche Information nicht eindeutig bestimmen.

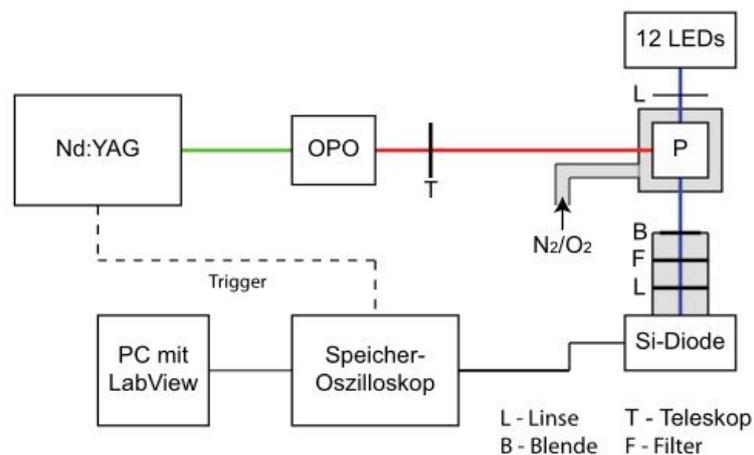
Aus diesem Grunde wurde in der AG Photobiophysik ein Messplatz zur Messung von Triplet-Lebensdauern gebaut. Das Messprinzip ist das in Abschnitt 5.4.1 bereits besprochene Pump-Probe-Verfahren (s. Abb. 19). Hiermit werden Triplet-Triplet-Übergänge induziert, wodurch sich das Absorptionsvermögen in Abhängigkeit von  $\Delta t$  im Bereich von mehreren ns bis einigen  $\mu\text{s}$  verfolgen lässt. Da sowohl die Lebensdauer des  $\text{S}_1$ -Zustandes als auch sämtliche IC-Prozesse sehr viel schneller ablaufen, entspricht die beobachtete zeitliche Relaxation eindeutig der, des Triplet-Zustandes (siehe Abb. 5).

Das  $\Delta\text{OD}$ -Signal (siehe Gl. 23) lässt sich mit Hilfe von Gl. (3) umformen, wobei die Konzentrationen des Triplet-Zustandes  $c_{T,0}$  und  $c_T(t)$  jeweils vor und nach der Anregung auftauchen:

$$\Delta\text{OD}(\lambda, t) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot (c_{T,0} - c_T(t)) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c_{T,0} \left( 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \right) \quad (32)$$

Ist nun die zeitliche Änderung der Testlichtintensität  $I(t)$  gering gegenüber der Gesamtintensität des Testlichtes, so ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen  $I(t)$  und  $\Delta\text{OD}$  [33]. Somit kann man durch eine Intensitätsmessung die Triplet-Lebensdauer ermitteln. Ein schematischer Aufbau des verwendeten Messplatzes ist in Abb. 24 zu sehen. Eine ausführliche Beschreibung findet der Leser in [33]. Die Anregung erfolgt durch einen Nd:YAG-Laser mit angeschlossenem OPO, welcher Anregungswellenlängen zwischen 420nm und 2500nm ermöglicht. Ein Teleskop (T) weitet das Anregungslicht auf die gesamte Breite der Küvette. Eine spezielle LED-Halterung befindet sich vor der Probe (P), senkrecht zur Anregung, sodass für den Teststrahl 12 verschiedene Wellenlängen zur Verfügung stehen. Eine kollimierende Linse geringer Fokusslänge (L) sorgt für parallel ankommende Strahlen. Die Küvette befindet sich in einer Probenkammer, wo ein  $\text{N}_2/\text{O}_2$ -Gemisch durch zwei Gasflussregler hereinfließt. Hierdurch

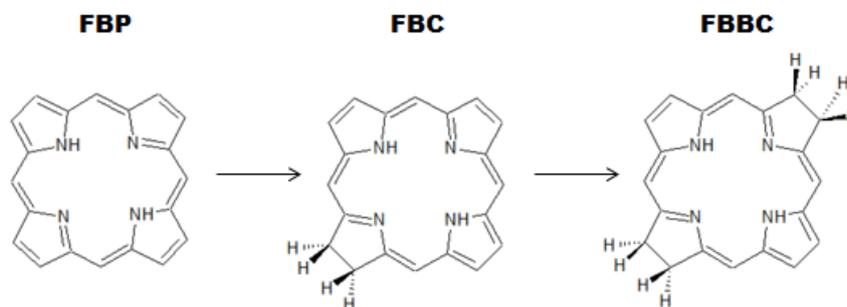
lässt sich der Sauerstoffpartialdruck einstellen. Das Signal wird schließlich mit einer abgeschirmten Si-Diode detektiert, verstärkt und an einem vom Laser getriggerten Speicher-Oszilloskop sichtbar gemacht. Die Daten werden mit einem von M. Sc. Tobias Bornhütter geschriebenen *LabView*-Programm verarbeitet.



**Abb. 24:** schematischer Aufbau des Flash Photolyse Messaufbaus (nach [33])

#### 4.7. Die untersuchten Systeme

Die in dieser Arbeit untersuchten synthetischen Verbindungen gehören der Chlorin- bzw. Bacteriochlorinreihe an. Sie unterscheiden sich, wie in Abschnitt 2.1.1 besprochen, an der Anzahl der reduzierten Doppelbindungen. Dieser Übergang wird in Abb. 25 für die einfachsten (unsubstituierten) makrozyklischen Strukturen dargestellt.

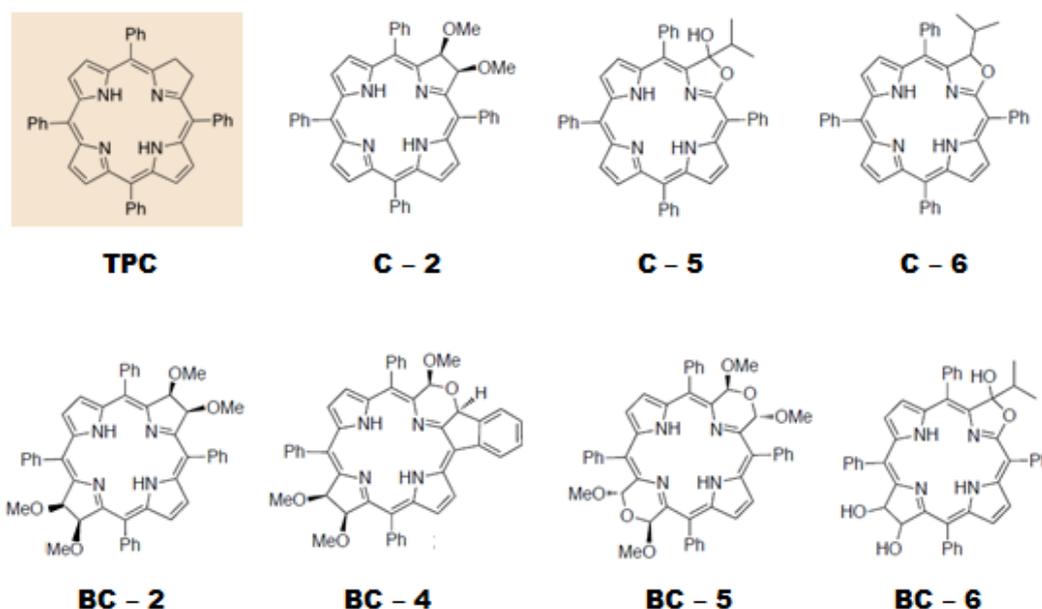


**Abb. 25:** Übergang vom Porphin zum Chlorin und zum Bacteriochlorin

Vom *free base* Porphin (FBP) erhält man durch einmalige Reduktion das *free base* Chlorin (FBC) und von diesem durch nochmalige Reduktion das *free base* Bacteriochlorin (FBBC). Dabei ändern die Molekülorbitale ihre energetische Lage wie vom Vier-Orbital-Modell vorhergesagt. Die spezifische Berechnung der Energieniveaus mittels semiempirischer Methoden für die in Abb. 25 gezeigt Moleküle sind in [80] zu finden.

Die für die hier untersuchten (Bacterio-)chlorine relevante Ausgangsverbindung ist das *meso*-Tetrakisphenylchlorin (TPC). Diese Struktur enthält noch vier zusätzliche Phenylgruppen (wie bereits gezeigt in Abb. 6), die mit –Ph abgekürzt werden. Details zur Synthese von *meso*-Phenylchlorinen und -Bacteriochlorinen findet man in der entsprechenden Literatur[37, 39, 40].

Die Lewis-Strukturen der Ausgangsverbindung sowie der untersuchten (Bacterio-)chlorine zusammen werden in Abb. 26 gezeigt. Für diese Arbeit gilt die interne Bezeichnung C- für Chlorine und BC- für Bacteriochlorine. Sämtliche Moleküle wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Brückner an der *University of Connecticut* hergestellt.



**Abb. 26:** Untersuchte Moleküle: Die Abkürzungen C- für die Chlorin- und BC- für die Bacteriochlorinreihe stellen eine interne Bezeichnung dar, welche in dieser Arbeit konsequent verwendet wurde. Die Ausgangsverbindung TPC wird ebenfalls gezeigt.

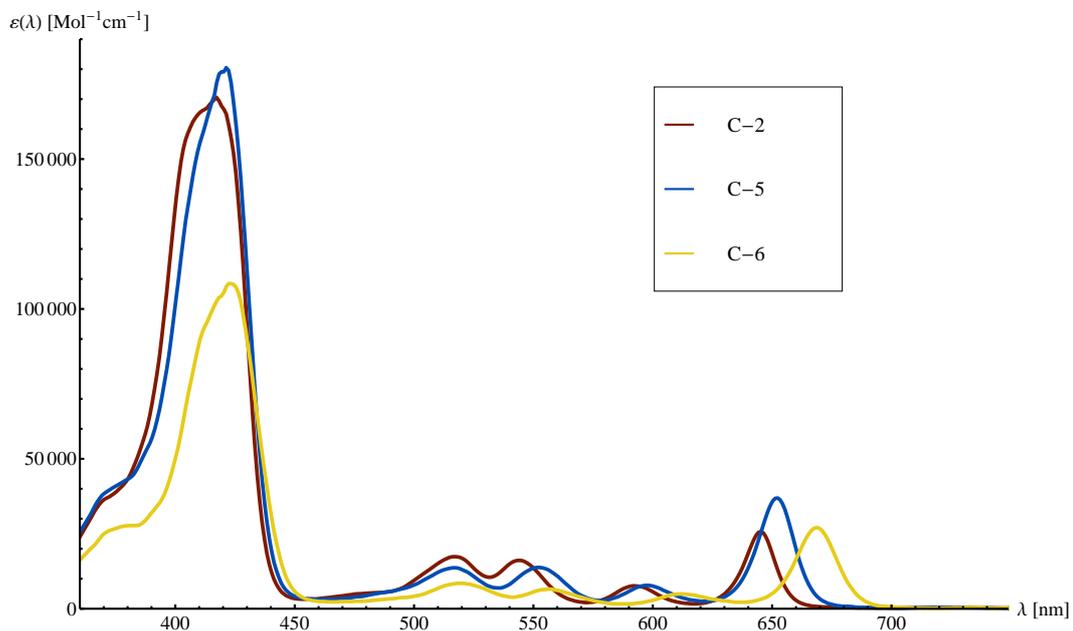
Sämtliche Proben wurden in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst und (wenn nicht anders angegeben) in 10mm Küvetten gemessen. Die OD betrug für die Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten sowie -lebensdauern etwa 0,1 bei der Anregungswellenlänge. Für die ps-TAS-Untersuchung wurde die OD auf 1,0 in der energetisch niedrigsten Bande eingestellt.

## 5. Stationäre Messungen

In diesem Abschnitt werden sämtliche Ergebnisse zu den photophysikalischen Untersuchungen dargestellt und miteinander verglichen.

### 5.1. Stationäre Absorption

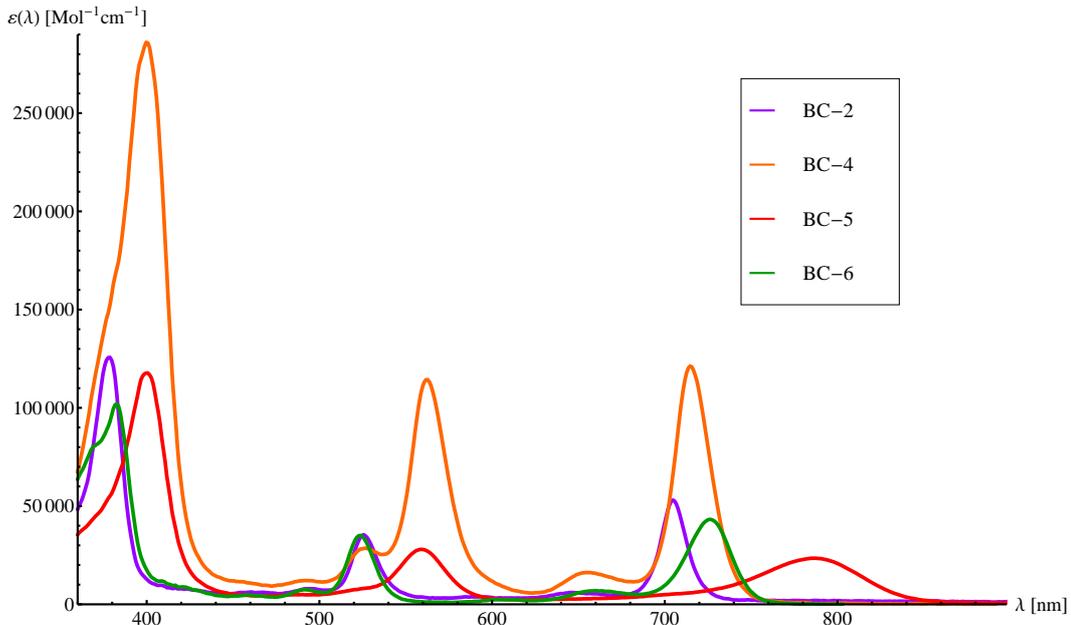
Durch stationäre Absorptionsspektroskopie und mit dem in Abschnitt 4.1 diskutierten Verfahren der Verdünnungsreihen wurde der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon(\lambda)$  jeder Verbindungen bestimmt. Dieser wird für die Chlorine in Abb. 27, für die Bacteriochlorine in Abb. 28 gezeigt.



**Abb. 27:** Absorptionsspektrum im Bereich 350-750nm der untersuchten Chlorine unter Angabe des Extinktionskoeffizienten

Die stationäre Absorption der metallfreien Chlorine verhält sich wie erwartet. Man erkennt bei allen die breite ( $\text{FWHM} \approx 35\text{nm}$ ) Soret-Bande bei etwa  $420\text{nm}$  sowie die aufgespaltenen  $Q_x$ - und  $Q_y$ -Banden im Bereich  $500-700\text{nm}$ . Ebenfalls charakteristisch für die Chlorine sind die verstärkten  $Q_y(0-0)$ -Übergänge, welche im energetisch niedrigsten Bereich auftauchen, d.h. gerade im für die PDT relevanten Bereich. Tabelle 2 fasst die Extinktionsmaxima und ihre spektrale Lage zusammen.

Im Falle der Bacteriochlorine ergeben sich ebenfalls charakteristische Spektren: es sind z.B. hauptsächlich nur noch die  $Q(0-0)$ -Übergänge zu erkennen. Dabei ändern sich die Verhältnisse der Intensität beträchtlich, denn es gilt ungefähr  $\varepsilon_{Bch}^Q \geq 0,3 \cdot \varepsilon_{Bch}^{Soret}$  während bei den Chlorinen die  $Q$ -Banden oft nicht einmal 10% der Intensität ihrer



**Abb. 28:** Absorptionsspektrum im Bereich 350-900nm der untersuchten Bacteriochlorine unter Angabe des Extinktionskoeffizienten

jeweiligen Soret-Bande erreichen. Zudem stellt man auch mit bloßem Auge eine bathochrome Verschiebung der  $Q_y$ -Banden fest, welche sich durch das Vier-Orbital-Modell erklären lässt. Diese Verschiebung fällt für die Verbindung BC-5 besonders stark aus. Ansonsten bleibt die spektrale Position der  $Q_x$ -Bande nahezu unberührt: ein Hinweis für (fast) gleiche energetische Abstände der  $x$ -polarisierten Zustände.

Besonders interessant ist der auffällig große Extinktionskoeffizient der Verbindung BC-4, der mit  $\varepsilon_{BC4}(400) \approx 2,9 \cdot 10^5 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  sogar jenen der Chlorine überholt. Somit werden zwei Schwingungsbanden zwischen Soret- und  $Q_x$ - sowie zwischen  $Q_x$ - und  $Q_y$ -Bande deutlich sichtbar (vgl. Tabelle 2).

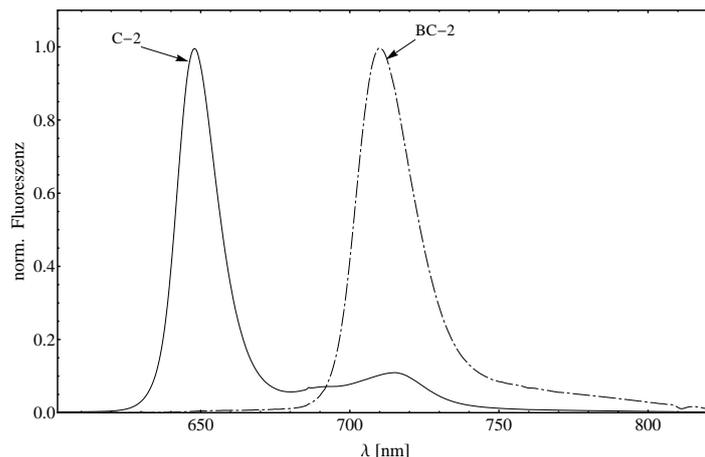
## 5.2. Stationäre Fluoreszenz

Die Fluoreszenzspektren von Chlorin C-2 und Bacteriochlorin BC-2 sind in Abb. 29 exemplarisch dargestellt. Die Anregung erfolgte für sämtliche Verbindungen im Bereich der Soret-Bande. Das Spektrum von C-2 lässt vermuten, dass die Fluoreszenz aus zwei unterschiedlichen Übergängen besteht, nämlich dem  $S_{1,0} \rightarrow S_{0,0}$ - sowie dem  $S_{1,0} \rightarrow S_{0,1}$ -Übergang. Dabei entsteht die bekannte spiegelverkehrte Form des Absorptionsspektrums, wobei der (spektrale) Abstand zwischen  $Q_y(1-0)$  und  $Q_y(0-0)$  im Absorptionsspektrum etwas kleiner ausfällt als der gleiche Abstand zwischen den *spiegelverkehrten* Banden in der Emission. Dieser Effekt ist auf die vibronische Wechselwirkung zurückzuführen und wurde in [49] ausführlich beschrieben. Die Chlorine C-5 und C-6 folgen ebenfalls diesem Verhalten, sodass sämtliche Chlorine als *reguläre* Porphyrine betrachtet werden können[10].

Molekül	$\varepsilon(\lambda)$ [ $10^3 \cdot \text{Mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]					$\lambda_{max}^{Fl}$ [nm]	$\Phi_{Fl}$
	Soret	$Q_x-(0-1)$	$Q_x-(0-0)$	$Q_y-(0-1)$	$Q_y-(0-0)$		
<b>C-2</b>	173,40 (419)	17,97 (517)	16,77 (543)	7,87 (593)	28,20 (645)	648	(0,25 $\pm$ 0.09)
<b>C-5</b>	189,99 (421)	14,16 (517)	14,08 (552)	8,12 (597)	39,43 (652)	657	(0,32 $\pm$ 0.09)
<b>C-6</b>	112,75 (425)	8,73 (519)	6,79 (555)	4,82 (609)	28,55 (668)	675	(0,23 $\pm$ 0.13)
<b>BC-2</b>	126,63 (378)	–	35,74 (525)	–	53,56 (705)	710	(0,17 $\pm$ 0.03)
<b>BC-4</b>	287,27 (400)	28,73 (526)	115,04 (562)	16,16 (654)	122,03 (715)	729	(0,08 $\pm$ 0.03)
<b>BC-5</b>	118,38 (400)	–	28,05 (560)	–	23,45 (785)	824	< 1%
<b>BC-6</b>	103,06 (383)	–	35,30 (523)	–	43,49 (726)	739	(0,10 $\pm$ 0.03)

**Tabelle 2:** Spektrale Lage der Extinktions- und Fluoreszenzmaxima, sowie Fluoreszenzquantenausbeuten aller untersuchten Verbindungen.

Das Bacteriochlorin BC-2 –wie auch die restlichen Bacteriochlorine– zeigt einen einzigen, zu längeren Wellenlängen verschobenen Fluoreszenzpeak. Dabei muss beachtet werden, dass es sich um normierte Spektren handelt, sodass sich die Emissionsintensitäten gemäss der Quantenausbeuten  $\Phi_{Fl}$  ändern. Diese wurden nach Gl. (19) mit Hilfe folgender Standards: TPP in Toluol ( $\Phi_{Fl,TPP} = 0,11$ )[14], TPPS in  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\Phi_{Fl,TPPS} = 0,09$ )[15] und Rhodamin 6G in  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\Phi_{Fl,Rh6G} = 0,90$ )[16] berechnet. Die berechneten Fluoreszenzquantenausbeuten sowie die spektrale Position der Fluoreszenzmaxima werden in Tabelle 2 angegeben. Eine kompakte Darstellung der einzelnen UV-VIS- und Fluoreszenzspektren unter Angabe des Stokes-Shifts findet der Leser im Anhang A. Bis auf bei Verbindung BC-5 wurde festgestellt, dass weder die spektrale Lage noch die Form des stationären Fluoreszenzspektrums von der Anregungswellenlänge abhängig ist. Für die Diskussion des abweichenden Verhaltens müssen die Anregungsspektren aufgenommen werden.

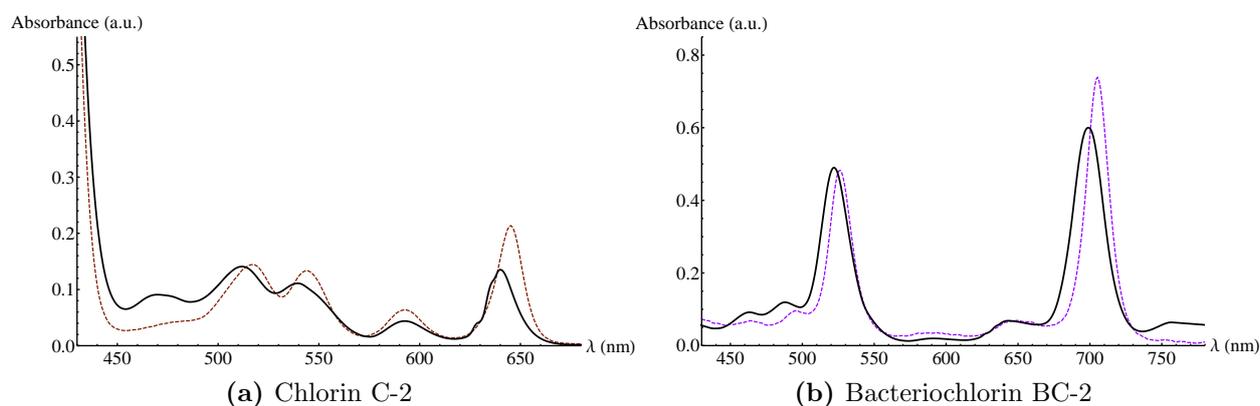


**Abb. 29:** Normierte Fluoreszenzspektren der Verbindungen C-2 und BC-2

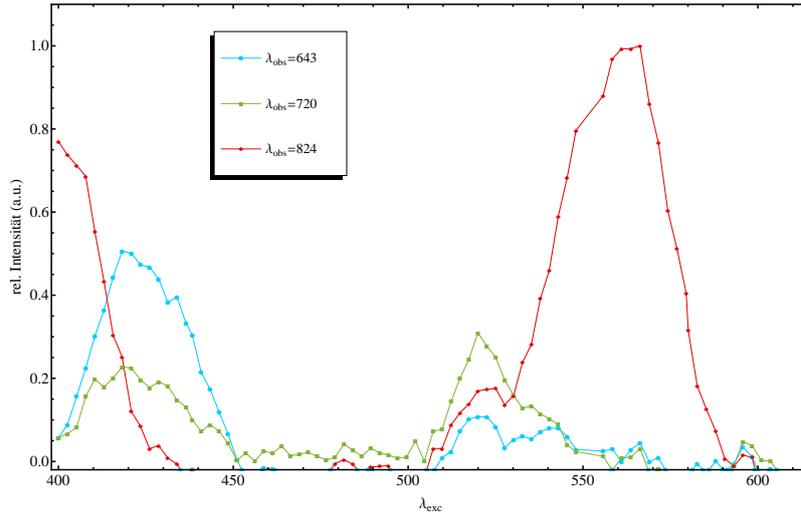
### 5.3. Anregungsspektroskopie

Da die Anregungsspektren derjenigen Verbindungen, die Kashas Regel gut erfüllen und rein vorliegen, ihren jeweiligen Absorptionsspektren entsprechen, wird hier zunächst nur eins für die Chlorin- und eins für die Bacteriochlorinreihe exemplarisch gezeigt und zwar für C-2 und sein strukturell entsprechendes Bacteriochlorin BC-2 (siehe Abb. 30). Zum Vergleich wurde das in Abschnitt 5.1 gezeigte Absorptionsspektrum hinzugefügt. Von vernachlässigbaren spektralen Verschiebungen abgesehen, konnten alle Banden korrekt rekonstruiert werden.

Anders war es beim Bacteriochlorin BC-5. Hier zeigt die Form des stationären Fluoreszenzspektrums eine klare Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Im Gegensatz zu den restlichen Verbindungen und aufgrund seiner sehr geringen Fluoreszenzquantenausbeute ( $<1\%$ ) konnte das Absorptionsspektrum von BC-5 mittels Anregungsspektroskopie nicht zufriedenstellend rekonstruiert werden. Sein Emissionsspektrum enthält



**Abb. 30:** Anregungsspektren von zwei Verbindungen (durchgezogene schwarze Linie). Zum besseren Vergleich wurden die Absorptionsspektren Abbn. 27 und 28 entnommen und entsprechend skaliert (gestrichelt).



**Abb. 31:** Anregungsspektrum der Verbindung BC-5: Schnitt längs der Achse der Anregungswellenlänge. Aufgetragen wurden die relativen Intensitäten bei drei festgehaltenen Beobachtungswellenlängen  $\lambda_{obs}$ .

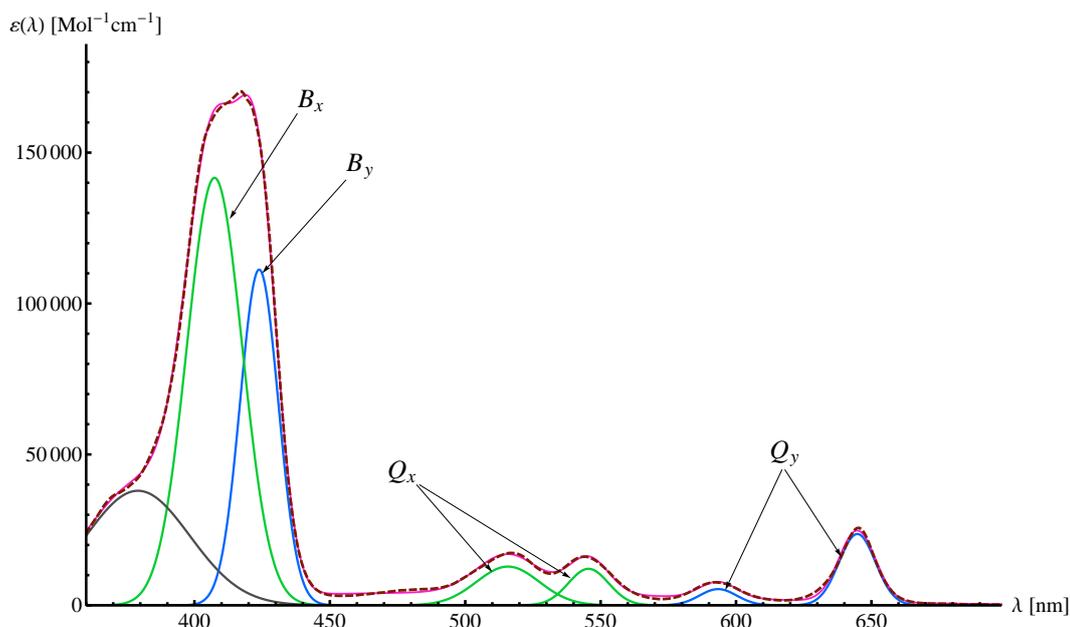
jedoch mehrere Komponenten je nach  $\lambda_{exc}$ . Dies geht aus Abb. 31 hervor, in der ein Schnitt längs der Achse der Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$  für drei verschiedene Beobachtungswellenlängen  $\lambda_{obs}$  zu sehen ist.

Dank dieser Auftragung wird ersichtlich, dass das Bacteriochlorin BC-5 nicht immer Photonen um die Wellenlänge  $\lambda_{Fl}^{(1)} = 824nm$  herum emittiert sondern auch welche um  $\lambda_{Fl}^{(2)} = 643nm$  und  $\lambda_{Fl}^{(3)} = 720nm$  herum je nach Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$ . Da die Intensität in den letzten beiden Bereichen beträchtlich kleiner ist als die bereits sehr kleine Fluoreszenzintensität bei  $824nm$  ist es gut möglich, dass das was man hier sieht, eine Vorstufe der Synthese ist. Solche Signale zeigen eine charakteristische Emission, wenn man in der Nähe der Soret Bande anregt[83].

## 5.4. Diskussion

Anhand der Ergebnisse der stationären Messungen sowie der theoretischen Erwartungen können wir nun unsere Diskussion vertiefen. Insbesondere die Chlorinreihe dient sehr gut dazu, die Vier-Orbital-Theorie zu bestätigen. Abb. 32 zeigt eine auf Gauss'schen Profilen basierende Rekonstruktion des Absorptionsspektrums vom Chlorin C-2. Es wurden zunächst die  $x$ - und  $y$ -polarisierten Übergänge zwischen den HOMO, HOMO-1 und den LUMO, LUMO+1 Orbitalen berücksichtigt.

Weiterhin wurde für jede der Q-Banden die erste Schwingungsbande ebenfalls in Betracht gezogen. Die Schulter, die man bei etwa  $\lambda = 380nm$  erkennt entspricht einem HOMO→HOMO+2 ( $\sigma$ )-Übergang, welcher z.B. mittels einer MNDO-PSDCI-Rechnung an der Stelle korrekt vorhergesagt werden kann[40] und ebenfalls für das Spektrum der Chlorine typisch ist, weshalb wir sie nicht ausführlicher diskutieren werden.



**Abb. 32:** Rekonstruktion des Absorptionsspektrums von C-2: *Grün:*  $x$ -polarisierte, *Blau:*  $y$ -polarisierte Übergänge. *Grau:*  $\sigma$ -Übergang. *Rosa:* Summe der einzelnen Gauss'schen Profile. *Gestrichelt:* Absorptionsspektrum vom Chlorin C-2 aus Abb. 27

#### 5.4.1. Über den Einfluss der Substituenten

Viel relevanter für unsere Diskussion sind die  $Q$ -Banden im VIS-Bereich. In Abb. 27 wird die Rolle, die die Substituenten spielen, deutlich.

Betrachten wir z.B. den Übergang zwischen den Chlorinen C-2→C-6: Statt die Doppelbindung symmetrisch durch Methylgruppen zu ersetzen wurde zum einen ein Sauerstoff-Atom in den Pyrrolring eingebaut, zum anderen eine Propylgruppe angehängt (C-6: *7-Propyl-8-oxa-5,10,15,20-tetrakisphenylchlorin*). Dies sorgt für einen beträchtlichen Verlust der Symmetrie entlang der  $y$ -Achse; das  $b_2$ -Niveau wird instabiler und wandert zu höheren Energien. Somit lässt sich die bathochrome Verschiebung des  $Q_y$ -Peaks erklären.

Eine weitere Größe, die offenbar von dieser Substitution betroffen ist, ist der Extinktionskoeffizient. Die Soret-Bande verringert sich um etwa 35% während die  $x$ -polarisierten  $Q$ -Banden sogar noch mehr an Intensität verlieren. Besonders interessant ist allerdings die Tatsache, dass die  $Q_y$ -Bande vom Chlorin C-6 etwa genauso intensiv ist (s. Tabelle 2) wie jene des Chlors C-2. Somit liegt diese innerhalb des photodynamischen Fensters, und man würde deshalb für die PDT eher C-6 als C-2 bevorzugen.

Der Übergang C-6→C-5 ist ebenfalls sehr aufschlussreich. Im Prinzip ersetzt man die Doppelbindung der Ausgangsverbindung TPP durch einen Lactolrest ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{O}-$ ) und hängt noch eine 2-positionierte Propylgruppe an. Der effektive Unterschied zu C-6 liegt lediglich in der dazu kommenden Hydroxyl-Gruppe und dennoch zeigt das Absorp-

tionsspektrum drastische Veränderungen: die Extinktion der Soret-Bande gewinnt so viel Intensität, dass sie wieder mit C-2 vergleichbar wird und die  $Q_y$ -Bande verschiebt sich (im Vergleich zu C-6) hypsochrom. Dies deutet stark darauf hin, dass die Hydroxyl-Gruppe die instabilisierende Wirkung der C-6-Substituenten etwas ausgleicht, denn das  $b_2$ -Niveau liegt nun tiefer. Bei dieser neuen Konfiguration wird der Übergang ebenfalls begünstigt: von allen drei Chlorinen besitzt C-5 die stärkste  $Q_y$ -Bande.

Dies zeigt den eindrucksvollen Einfluss der Substituenten auf die Absorptionsfähigkeit von potentiellen Photosensibilisatoren. Dabei veränderten wir hauptsächlich die spektrale Lage und die Extinktion der Banden. Im folgenden Abschnitt werden wir sehen, wie die Verhältnisse der Q-Banden zueinander aufgrund der Reduktion einer weiteren Doppelbindung beeinflusst werden.

#### 5.4.2. Übergang von der Chlorin- zur Bacteriochlorinkonfiguration

Ersetzt man nun in C-5 eine weitere Doppelbindung durch OH-Gruppen (siehe Abb. 26), so erhält man das Bacteriochlorin BC-6 (*2-Propyl-3-oxa-17,18-diol-meso-tetraphenylbacteriochlorin*). Sowohl die Soret- als auch die  $Q_x$ -Bande von BC-6 zeigen eine deutliche hypsochrome Verschiebung.

Dieser Effekt ist unmittelbar mit der Reduktion der zweiten Doppelbindung verbunden: es ist vor allem die elektronische Konfiguration des  $c_1$ -Niveaus, die unter einer eingeschränkteren CI leidet, weil sie an der Stelle der reduzierten Doppelbindung, wie es aus Abb. 9 hervorgeht, eine starke Elektronendichte aufweist: das  $c_1$ -Niveau verschiebt sich folglich zu höheren Energien. Dadurch vergrößern sich aber nicht nur die energetischen Abstände zwischen den B- und Q-Banden, sondern auch die Abstände innerhalb der B-Bande selbst. Man beobachtet (siehe Abb. 28) eine deutliche Aufspaltung der Soret-Bande, die auf einen größeren energetischen Abstand zwischen den  $B_x$ - und  $B_y$ -Übergängen zurückzuführen ist.

Zudem liegt offenbar die weniger intensive  $B_y$ -Bande nun energetisch höher als die  $B_x$ -Bande, im Vergleich zu C-2 also in umgekehrter Reihenfolge (s. Abb. 32). Dies bestätigt wieder einmal, dass das  $c_1$ -Niveau energetisch höher liegen muss.

Aufgrund der niedrigen Elektronendichte in der Nachbarschaft der 2,3,12, und 13-positionierten C-Atome verbleiben sowohl der  $b_1$ - als auch der  $c_2$ -Zustand in der Nähe ihrer ursprünglichen energetischen Höhe. Im Gegensatz dazu, wird der  $b_2$ -Zustand im Übergang Chlorin→Bacteriochlorin weiter destabilisiert. Dies führt folglich zur bathochromen Verschiebung der durch den Faktor  $\langle c_2|b_2 \rangle$  bestimmten  $Q_y$ -Bande, welche nun im Falle von BC-6 ihr Maximum bei  $\lambda = 726nm$  hat.

Das Absorptionsvermögen von C-5 wird demnach im Übergang zu BC-6 vom Rande zur Mitte des photodynamischen Fensters geschoben, wobei die Extinktion im  $Q_y(0-0)$ -Übergang sogar leicht zunimmt. Besonders interessant für die PDT ist aber der Übergang C-2→BC-2: bei BC-2 liegt nicht nur die  $Q_y$ -Bande spektral günstiger als beim strukturell entsprechenden Chlorin, ihr Extinktionskoeffizient hat sich dabei auch noch fast verdoppelt.

Schließlich lässt sich auch im Falle der Bacteriochlorine BC-2 und BC-6 der für die Chlorine ausführlich diskutierte Substituenteneffekt beobachten. Von der Aufspaltung der Soret-Bande abgesehen, unterscheiden sich die beiden lediglich in der spektralen Position ihrer jeweiligen  $Q_y$ -Bande. Verantwortlich hierfür ist wieder einmal die Symmetriebrechung entlang der  $y$ -Richtung, die die Lactol- und Propylgruppen verursachen.

### 5.4.3. Die Benziporphyrine

Obgleich die Verbindungen BC-4 und BC-5 sich vom Absorptionsspektrum her wie Bacteriochlorine verhalten, treten bei diesen beiden Molekülen besondere Effekte auf, die eine weitere Diskussion erfordern. Diese beide Moleküle gehören zu den Benziporphyrinen, über die Berlin und Breitmaier[50] zum ersten Mal berichteten.

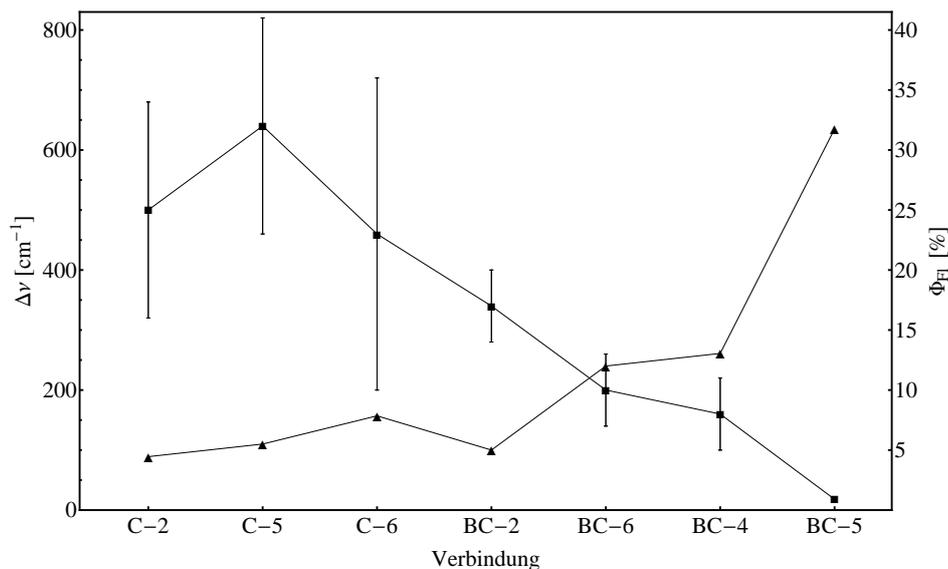
BC-4 zeigt mit Abstand den grössten Extinktionskoeffizient aller untersuchten Moleküle. Dies dürfte mit seiner Struktur zusammenhängen, denn seine 10-Phenylgruppe ist an die restliche Ringstruktur mittels einer  $\beta$ -O-Phenyl-Brücke ( *$\beta$ -to-o-phenyl linkage*[48]) gebunden. Es liegt also nahe, dass sein  $\pi$ -Elektronensystem dadurch erweitert wird und seine Oszillatorstärke zunimmt.

Im Falle von BC-5 beobachtet man im Gegensatz dazu einen der schwächsten Extinktionskoeffizienten. Dazu kommt die auffällige Breite der  $Q$ -Banden, welche die Vermutung nahelegt, dass es sich um das Spektrum eines Dimers (bzw. Oligomere höherer Ordnung) handelt. Es ist bekannt, dass sich die photophysikalischen Eigenschaften eines Dimers deutlich ändern im Vergleich zum entsprechenden Monomer. Die IC-Rate  $k_{IC}$  des Dimers erhöht sich üblicherweise beträchtlich[47] und oft treten Selbstquenchingeffekte auf[46], sodass die für die PDT relevanten Parameter stark gedämpft werden. Sollte es sich aber doch um ein Monomer handeln, so käme die Nicht-Planarität des Moleküls als einziges Argument in Frage für die Erklärung dieses untypischen optischen Verhaltens.

### 5.4.4. Zur Flexibilität der Moleküle

Wie bereits besprochen (s. Abschnitt 2.1.1) sind Porphyrinderivate rigide Moleküle. Für solche unflexiblen Moleküle erwartet man ein Stokes-Shift ( $\Delta\nu$ ) in der Größenordnung  $\Delta\nu \approx 100\text{cm}^{-1}$ [10]. Insbesondere für die Chlorine trifft dies sehr gut zu (s. Anhang A). Da bei den Bacteriochlorinen eine weitere Doppelbindung reduziert wird, erwartet man, dass diese etwas flexibler werden[39]. Daraus sollte ein größerer Stokes-Shift resultieren.

Zudem erwiesen sich Porphyrinderivate, bei denen ein Benzolring eine pyrrolische Einheit ersetzt, als äusserst flexible Strukturen[51]. Somit können wir, wenn auch nicht streng quantitativ, zumindest rein phänomenologisch eine Reihenfolge begründen, die die untersuchten Moleküle nach ihrem Flexibilitätsgrad trennt: die Chlorine seien die rigidesten, die klassischen Bacteriochlorine (BC-2 und BC-6) etwas flexibler als die ersten und die Benziporphyrine könnte man schließlich als recht flexibel bezeichnen. Nun tragen wir  $\Delta\nu$  für jedes Molekül graphisch auf (s. Abb. 33) und stellen Folgendes fest: anscheinend nimmt  $\Delta\nu$  mit dem Flexibilitätsgrad der Moleküle zu.



**Abb. 33:** Korrelation der Parameter  $\Delta\nu$  und  $\Phi_{FL}$ : die Flexibilität legt die Reihenfolge fest. C-2 sei nahezu starr, BC-5 das flexibelste. (■ :  $\Phi_{FL}$ ; ▲ :  $\Delta\nu$ )

Darüber hinaus zeigt diese Abbildung wie die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{FL}$  mit diesem Phänomen korreliert: würden die zwei Chlorine C-2 und C-5 ihre Plätze tauschen, so nähme die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{FL}$  für die gewählte Reihenfolge sogar stetig ab. Dies deutet auf eine gewisse Abhängigkeit zwischen der *Form* der Moleküle und ihrer photophysikalischen Eigenschaften hin. Für eine noch ausführlichere Diskussion über die Korrelation photophysikalischer Parameter wenden wir uns nun den zeitaufgelösten Messungen zu.

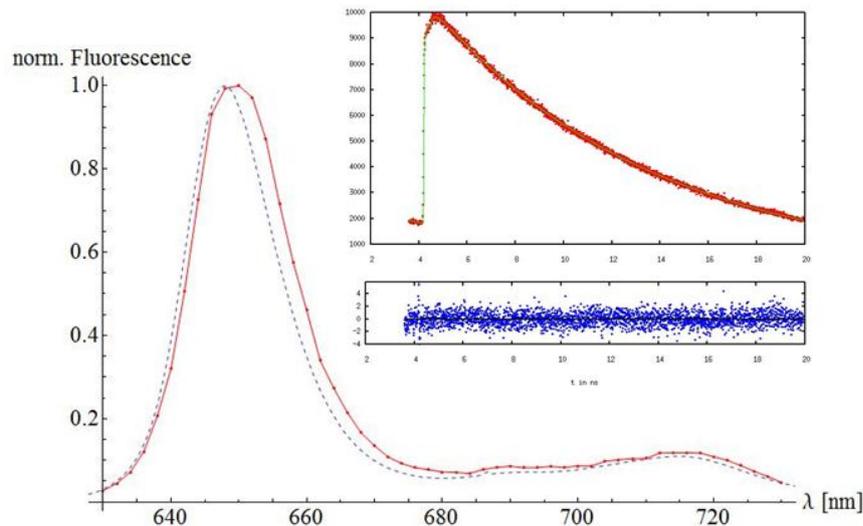
## 6. Zeitaufgelöste Messungen

### 6.1. Ergebnisse

**TCSPC** Das zeitliche Verhalten der Fluoreszenz wurde, wie in Abschnitt 4.3, untersucht. Dabei konnten sämtliche Daten einwandfrei monoexponentiell gefittet werden. Die bestimmten Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_{FL}$  befinden sich in Tabelle 3 und liegen im erwarteten ns-Bereich (s. Abb. 5).

Ein einziger Wert im sub-ns-Bereich von etwa  $320\text{ps}$  wurde gefunden und zwar für das Bacteriochlorin BC-5. Aufgrund der sehr geringen Fluoreszenzquantenausbeute konnte auch kein zufriedenstellendes DAFS-Spektrum erstellt werden. Ansonsten wurden für alle restlichen Verbindungen solche Plots erstellt und der Monomercharakter der Substanzen in Lösung bestätigt.

Exemplarisch wird in Abb. 34 die Konvolutionskurve (siehe Gl. 22) für das exponentielle Abklingen des Fluoreszenzsignals (Anregung bei  $532\text{nm}$ ) sowie die Residuen und die



**Abb. 34:** TCSPC-Fit und DAFS-Spektrum des Chlorins C-2: *Hauptbild:* Durch schrittweise Wiederholung der TCSPC-Messung wurde das Fluoreszenzsignal rekonstruiert (rote durchgezogene Kurve). Zum Vergleich wurde das stationäre Spektrum hinzugefügt (blau gestrichelt). *Insert:* im oberen Bild sind die erhaltenen Messpunkte (rot) der TCSPC-Messung. Im Maximum wurden 10000 Counts registriert. Die verbindende Kurve (grün) entspricht der Faltung von Messdaten und IRF (nicht gezeigt) nach Gl. 22. Im unteren Bild sieht man die Residuen, welche sich für eine gute Messung rein statistisch verteilen.

Rekonstruktion des stationären Fluoreszenzspektrums mittels DAFS für die Verbindung C-2 gezeigt. Das DAFS-Spektrum folgt der stationären Fluoreszenz und es liegen sonst keine weiteren Komponenten vor. Da im Wesentlichen für alle anderen Moleküle ein ähnliches Verhalten beobachtet wurde verzichten wir an dieser Stelle auf weitere graphische Darstellungen (diese findet der Leser im Anhang).

**Die Triplett-Parameter** Mittels ps-TAS wurden die  $S_1$ -Lebensdauer  $\tau_{S_1}$  sowie die ISC-Quantenausbeute  $\Phi_{ISC}$  bestimmt. Tabelle 3 enthält die Ergebnisse.

Die  $\Delta OD$ -Signale vom Chlorin C-6 werden in Abb. 35, diejenigen vom Bacteriochlorin BC-5 in Abb. 36 exemplarisch gezeigt. Die  $\Delta OD$ -Signale der restlichen Verbindungen sind im Anhang D zu sehen. Der Übersicht halber werden nicht alle, sondern nur ausgewählte Kurven ( $\Delta t$ ) gezeigt.

Die Anregung ist bei  $\Delta t=60ps$  abgeschlossen, und bei den meisten Verbindungen erreicht das negative  $\Delta OD$ -Signal auch hier sein Maximum. Zur Berechnung von  $\Phi_{ISC}$  wurden alle Messpunkte ab diesem Wert berücksichtigt. Die Auswerteprozedur erzwingt zunächst das Abklingen mit dem bei der TCSPC-Messung erhaltenen  $\tau_{FL}$ .

Das für Chlorine typische Verhalten geht aus Abb. 35 hervor: nach abgeschlossener Anregung wird der Grundzustand wieder besetzt, bei  $\Delta t=15ns$  ist jedoch eine anhaltende

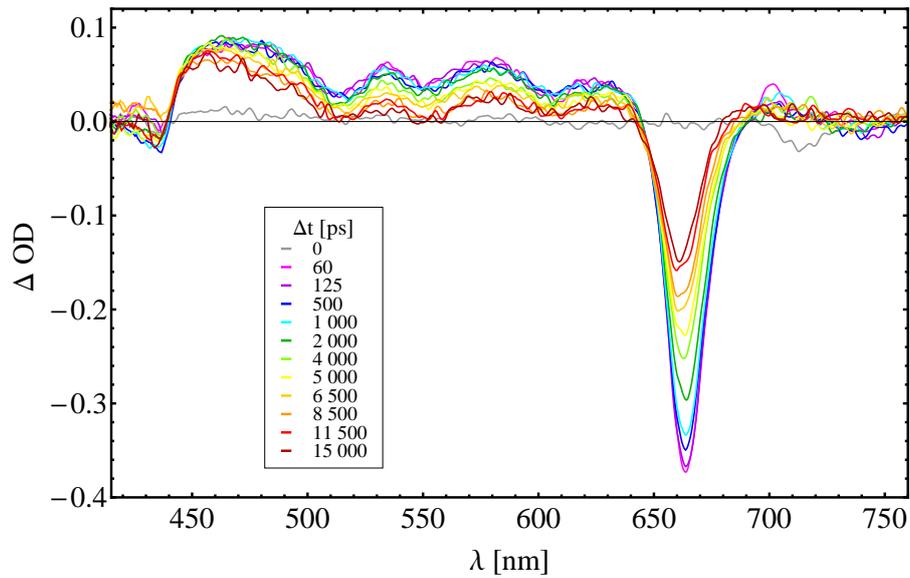
Molekül	$\Phi_{Fl}$	$\tau_{Fl}$	$\tau_{S1}$	$\Phi_{ISC}$	$\Phi_{\Delta}$	$\tau_T$	$\tau_{\Delta}$
		$\pm 0,02$ [ns]	$\pm 10\%$ [ns]	$\pm 3\%$	$\pm 10\%$	$\pm 5\%$ [ $\mu s$ ]	$\pm 10\%$ [ $\mu s$ ]
<b>C-2</b>	(0,25 $\pm$ 0,09)	9,12	8,93	0,67	0,66	0,46	19,88
<b>C-5</b>	(0,32 $\pm$ 0,09)	6,63	7,03	0,66	0,63	0,42	18,61
<b>C-6</b>	(0,23 $\pm$ 0,13)	6,19	6,52	0,57	0,54	0,39	18,42
<b>BC-2</b>	(0,17 $\pm$ 0,03)	5,13	5,40	0,45	0,40	0,49	17,46
<b>BC-4</b>	(0,08 $\pm$ 0,03)	3,90	3,99	0,54	0,50	0,58	16,28
<b>BC-5</b>	<1%	0,32	0,45	0,87	0,12	0,47	11,66
<b>BC-6</b>	(0,10 $\pm$ 0,03)	3,19	2,78	0,44	0,33	0,41	18,33

**Tabelle 3:** Photophysikalische Parameter: Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl}$ , ISC-Quantenausbeute  $\Phi_{ISC}$ , Lebensdauer des  $S_1$ -Zustandes  $\tau_{S1}$ , Lebensdauer des  $T_1$ -Zustandes  $\tau_T$ , Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute  $\Phi_{\Delta}$  und Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer  $\tau_{\Delta}$ .

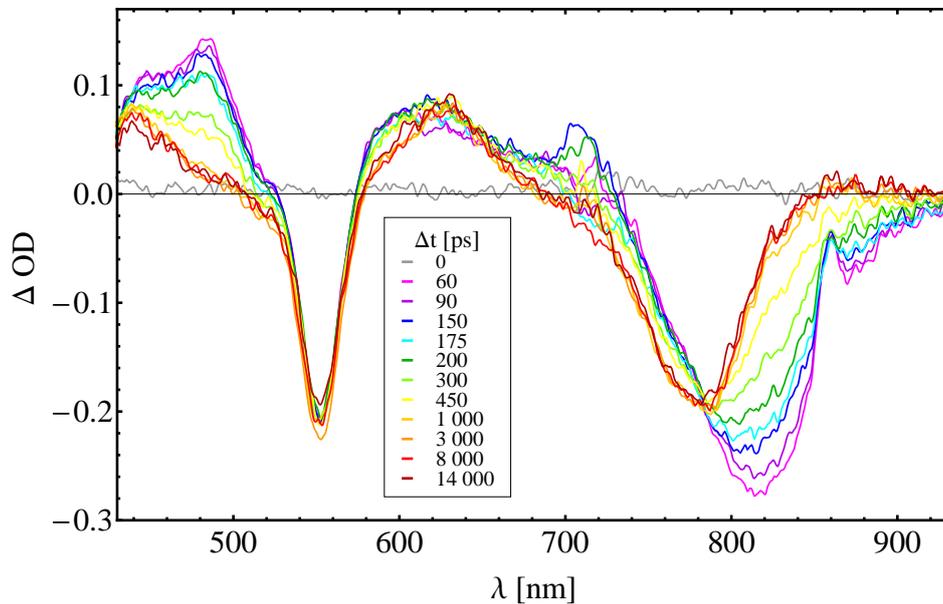
teilweise Grundzustandsentleerung noch sichtbar. Dies verweist auf die deutlich längere Lebensdauer des  $T_1$ -Zustandes. Im Bereich der gesättigten Absorption erkennt man *grosso modo* das Absorptionsspektrum der Verbindung (vgl. Abbildung des Anhangs A). Etwas interessanter ist das ps-TAS-Spektrum von Bacteriochlorin BC-5 (Abb. 36). Man sieht wie das  $\Delta OD$ -Signal im spektralen Bereich um  $\lambda \approx 820 nm$  aufgrund der abnehmenden transienten Verstärkung wandert. Dies bestätigt den berechneten Stokes-Shift. Nach etwa  $1000 ps$  ( $\approx 3 \cdot \tau_{Fl, BC5}$ ) bleibt vom  $\Delta OD$ -Signal nur noch eine anhaltende teilweise Grundzustandsentleerung übrig, was auch wiederum mit dem Ergebnis der zeitaufgelösten Fluoreszenz hervorragend korreliert.

Durch Laser Flash Photolyse wurden die Triplett-Lebensdauern  $\tau_T$  bestimmt. Diese lagen alle im erwarteten  $\mu s$ -Bereich und bestätigten die für die  $^1O_2$ -Lumineszenzmessung erhaltenen Anstiegszeiten.

**$^1O_2$ -Messungen** Wie in Abschnitt 4.5.4 beschrieben, wurden Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten  $\Phi_{\Delta}$  bestimmt. Tabelle 3 zeigt sowohl  $\Phi_{\Delta}$  als auch die durch Quenching bestimmte Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer  $k_Q^{-1} = \tau_{\Delta}$ . Diese liegt für alle Verbindungen, mit Ausnahme vom Bacteriochlorin BC-5, im für DMF charakteristischen Bereich[52]. Je nach Verbindung wurden zum Anregen unterschiedliche Bereiche des Absorptionsspektrums, zur Berechnung von  $\Phi_{\Delta}$  einer der folgenden Standards gewählt: Phäophorbid *a* ( $\Phi_{\Delta} = 0,52$ )[36] und TPP ( $\Phi_{\Delta} = 0,67$ )[53].



**Abb. 35:** Ergebnisse der ps-TAS-Messung des Chlorins C-6: Ein Maximum im (negativen)  $\Delta OD$ -Signal wird nach  $60ps$  erreicht. Der weitere Verlauf des  $\Delta OD$ -Signals wird für ausgewählte Verzögerungszeiten  $\Delta t$  geplottet.



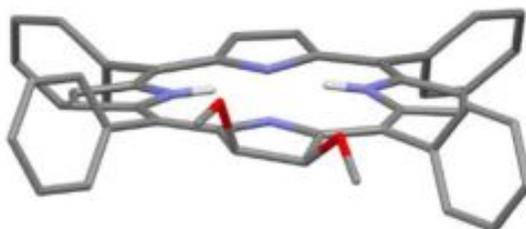
**Abb. 36:** Ergebnisse der ps-TAS-Messung des Bacteriochlorins BC-5: Ein Maximum im (negativen)  $\Delta OD$ -Signal wird nach  $60ps$  erreicht. Der weitere Verlauf des  $\Delta OD$ -Signals wird für ausgewählte Verzögerungszeiten  $\Delta t$  geplottet.

## 6.2. Diskussion

### 6.2.1. Zur Nicht-Planarität der Moleküle

Bei unserer Diskussion über die Flexibilität der Moleküle gaben wir eine Reihenfolge der untersuchten Verbindungen an, die wir nun semi-quantitativ begründen wollen. Hierbei geht es nicht mehr darum, wie flexibel die Moleküle sind, sondern wie stark sie, bei gegebener Anzahl und Position der Substituenten, von einer planaren Struktur abweichen. Dieser Sachverhalt wurde bereits untersucht und in [62] unter Angabe der unterschiedlichen räumlichen Konfigurationen, die die substituierten Porphyrine annehmen können, zusammengefasst und grundlegend diskutiert.

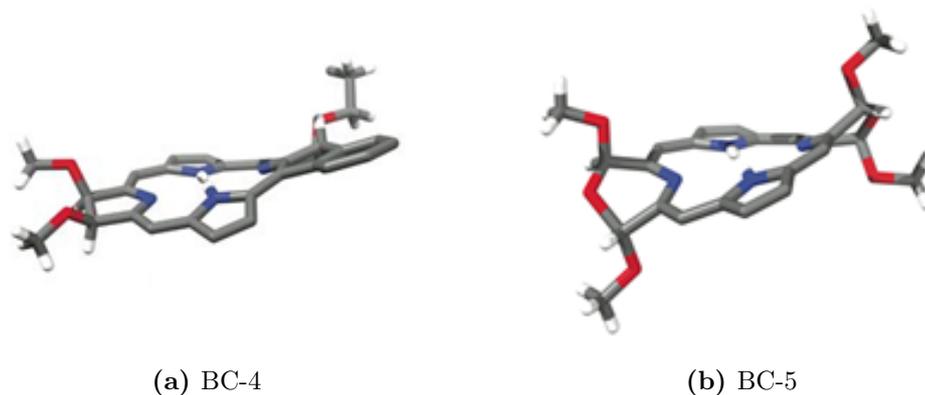
Bei der gegebenen Substitution der hier untersuchten (Bacterio-)Chlorine kommt nur die sog. *saddle*-Beulung in Frage. Für die Chlorinreihe aber ist, wie in Abschnitt 2.1.1 bereits erwähnt, kaum eine Krümmung vorhanden. Dies wird ersichtlich durch die dreidimensionale Visualisierung des Chlorins C-2 in Abb. 37.



**Abb. 37:** 3D-Visualisierung des Chlorins C-2: für eine bessere Übersicht wurden sämtliche CH-Wasserstoffatome nicht dargestellt. N-Atome sind blau-, Methoxygruppen sind rot-markiert. (nach [39])

Hier erkennt man sofort, dass der Porphyrinring eine planare Struktur bildet und somit eine Ebene, die Schwerpunktebene, definiert. Diese Ebene besitzt die geringste mittlere quadratische Abweichung. Die kleinen Abweichungen bei C-2 sind praktisch nur auf die Methylgruppen zurückzuführen. Solche Abweichungen werden mittels des mittleren Abstandes  $\eta$  der Atome außerhalb der Schwerpunktebene zur Schwerpunktebene quantifiziert.

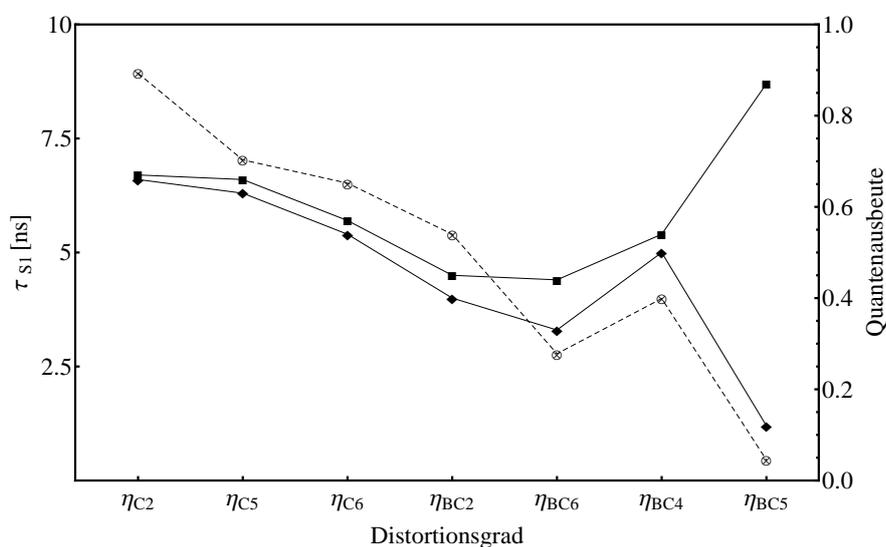
Eine systematische quantitative Analyse, bei der eine kontrollierte Verbiegung von TPP durch sukzessives Hinzufügen von  $\beta$ -ethyl-Gruppen erreicht wurde, wurde bereits veröffentlicht[58]. Hier entspricht die erste Substitution nicht exakt den in dieser Arbeit behandelten Chlorinen, weil die Ethyl-Gruppen an die 2 und 3-positionierten Kohlenstoffatome angehängt und somit keine Doppelbindungen aufgelöst wurden. Trotzdem orientiert sich diese Arbeit an den dort errechneten Mittelwerten, denn die kleinen Abweichungen der Chlorinreihe übertreffen bei Weitem nicht die Größenordnung der Verbiegung, die bei Bacteriochlorinen typisch ist (siehe Abb. 38).



**Abb. 38:** 3D-Visualisierung der Benziporphyrine (mit frdl. Gen. von: C. Brückner)

Nach diesen Überlegungen ist es naheliegend, dass der Distortionsgrad in der Reihenfolge zunimmt:  $\eta_{C2} < \eta_{C5} < \eta_{C6} < \eta_{BC2} < \eta_{BC6} < \eta_{BC4} < \eta_{BC5}$ . Die graphische Auftragung der Triplett-Parameter nach dem Distortiosgrad (Abb. 39) zeigt zunächst einmal, dass die Lebensdauer  $\tau_{Fl}$  gemäß der Erwartung  $\tau_{Fl} \sim \Phi_{Fl}$  dem Verhalten der in Abb. 33 gezeigten Fluoreszenzquantenausbeuten folgt. Ein ähnliches Verhalten ergab sich für die Interkombinationsquantenausbeute  $\Phi_{\Delta}$ .

Etwas anders fällt das Verhalten der ISC-Quantenausbeuten aus: die Erwartung,  $\Phi_{ISC}$  nähme mit zunehmender Distortion ab, konnte nur für die Chlorine sowie die klassischen Bacteriochlorine eindeutig erkannt werden. Den niedrigsten Wert besitzt BC-6 mit



**Abb. 39:** Korrelation der photophysikalischen Parameter ( $\otimes$  :  $\tau_{Fl}$ ;  $\blacksquare$  :  $\Phi_{ISC}$ ) mit dem Distortionsgrad  $\eta$ : das Verhalten der  $S_1$ -Lebensdauer folgt erwartungsgemäss den Fluoreszenzquantenausbeuten. Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten ( $\blacklozenge$  :  $\Phi_{\Delta}$ ) werden ebenfalls gezeigt.

$\Phi_{ISC,BC6} = 44\%$ . Die Benziporphyrine fallen in ihrem Verhalten aus dieser Reihe: BC-4 hat mehr als 50% und BC-5 zeigt den höchsten Wert mit  $\Phi_{ISC,BC5} = 87\%$ . Ein ähnliches Verhalten fanden die Autoren in [58] für die Verbindung OETPP (*2,3,7,8,12,13,17,18-octaethyl-5,10,15,20-tetraphenylporphyrin*), welche eine sehr hohe mittlere Abweichung von der planaren Struktur hat. Hier wird ersichtlich, dass die räumliche Konformation nur bedingt den Wert von  $\Phi_{ISC}$  senkt.

### 6.2.2. $^1O_2$ -Generierung

Ein weiterer Zusammenhang, den man in Abb. 39 gut erkennt, betrifft die Produktion von Singulett-Sauerstoff. Für die Chlorine kann man in guter Näherung behaupten, dass jedes Molekül, das in den Triplett-Zustand gelangt auch Singulett-Sauerstoff generiert. Die Beziehung zwischen Interkombinationsquantenausbeute  $\Phi_{ISC}$  und Singulett-Sauerstoffquantenausbeute  $\Phi_{\Delta}$  lautet:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{ISC}(k_{T \rightarrow \Delta}/k_{PS}) = S_{\Delta} \cdot S_Q \cdot \Phi_{ISC} \quad (33)$$

wobei  $k_{T \rightarrow \Delta}$  die in Abschnitt 3.2.2 eingeführten Energietrasferrate,  $k_{PS}$  die Rate ist, mit der molekularer Sauerstoff den sich im Triplett-Zustand befindenden Photosensibilisator PS quencht. Der Faktor  $S_{\Delta}$  steht für denjenigen Anteil von durch Sauerstoff gequenchten PS-Molekülen, die Singulett-Sauerstoff generieren,  $S_Q$  für jenen von PS-Molekülen, die in irgendeiner Form durch Wechselwirkung mit Sauerstoff gequencht werden.

Offensichtlich gilt für alle Verbindungen mit Ausnahme von BC-5,  $S_{\Delta} \approx S_Q \approx 1$ , wie es für die meisten Porphyrine in luftgesättigter Lösung zu erwarten ist[63].

## 7. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

**Zusammenfassung der Ergebnisse** Es wurden die photophysikalischen Eigenschaften von mehreren metallfreien, zu der Chlorin- sowie Bacteriochlorinreihe gehörenden Verbindungen untersucht. Hierbei wurde der Fokus darauf gerichtet, inwiefern diese für die PDT geeignet sind. Das optische Verhalten, wie beispielsweise die verstärkte, rotverschobene  $Q_y$ -Bande der Chlorine, konnte mit Hilfe des Vier-Orbital-Modells gedeutet werden. Desweiteren ist der Übergang von der Chlorin- in die Bacteriochlorin-konfiguration für eine weitere Rotverschiebung der  $Q_y$ -Bande, sowie für eine verstärkte  $Q_x$ -Bande, verantwortlich. Gezeigt wurde, wie die Absorptionsfähigkeit eines Moleküls durch die Wahl der Substituenten spektral moduliert werden kann.

Chlorine erwiesen sich als eher planare, sehr starre, Bacteriochlorine hingegen als verbogene, flexiblere Moleküle. Einerseits korreliert die Fluoreszenz mit dem Flexibilitätsgrad der Moleküle, andererseits konnte ebenfalls die Korrelation zwischen den photophysikalischen Parameter  $\tau_{FI}$ ,  $\Phi_{\Delta}$  und  $\Phi_{ISC}$  und der räumlichen Konformation der Verbindungen nachgewiesen werden. Durch diese Beobachtung lässt sich aufzeigen, dass sämtliche Chlorine sowie die regulären Bacteriochlorine BC-2 und BC-6 ein zu erwartendes Verhalten haben, wohingegen die expandierten Bacteriochlorine BC-4 und BC-5 untypische Merkmale aufweisen.

Im Falle von Bacteriochlorin BC-5 lassen sich folgende zusammenfassende Bemerkungen stichpunktartig formulieren:

- die Absorptionsbanden sind besonders breit und sehr stark rotverschoben
- der  $S_1$ -Zustand wird sehr schnell entleert. Die Lebensdauer  $\tau_{S_1}=320ps$  liegt im typischen Bereich für Dimere
- im Gegensatz zu den klassischen Bacteriochlorinen steigt, bei fallender  $\tau_{S_1}$ , die Interkombinationsquantenausbeute und zwar bis zum ungewöhnlich hohen Wert von  $\Phi_{ISC,BC5}=0,87$
- nur für dieses Molekül gilt  $\Phi_{\Delta,BC5}\approx 0,14\cdot\Phi_{ISC,BC5}$ , wobei für die restlichen Verbindungen in guter Näherung die Einheit einzusetzen ist
- die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer  $\tau_{\Delta,BC5}=11,66\mu s$  weicht stark vom für DMF zu erwartenden Wert ab

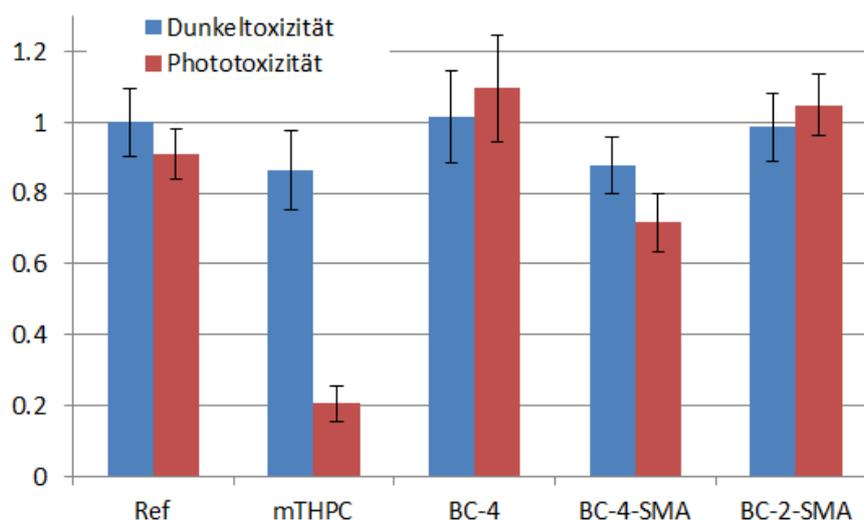
Somit ist das stark verbogene Bacteriochlorin BC-5 eine besonders interessante Verbindung, deren photophysikalisches Verhalten viele Fragen aufwirft. Die sehr breiten Absorptionsbanden, die kurze  $S_1$ -Lebensdauer, sowie die verkürzte, vermutlich auf starkes Selbstquenching zurückzuführende Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer, weisen auf Dimerbildung hin. Dennoch bleibt diese Frage noch offen, da wir hierfür keinen direkten Beweis erhielten (Abb. E).

Das Bacteriochlorin BC-4 hat den höchsten Extinktionskoeffizient von allen Verbindungen. Sein  $S_1$ -Niveau liegt um  $\lambda=715nm$  herum, wie es für Bacteriochlorine charakteristisch ist. Dies zusammen mit einer hohen Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von

$\Phi_{\Delta,BC4} = 0,54$  und seiner guten Löslichkeit in DMSO (DMSO: *Dimethylsulfoxid*) machen es im Sinne von Abschnitt 3.3 zu einem guten Kandidaten für einen Zellversuch. Ziel dieser Untersuchungen war es, zu prüfen, ob die Substanzen potentiell als Wirkstoffe in der PDT Anwendung finden könnten.

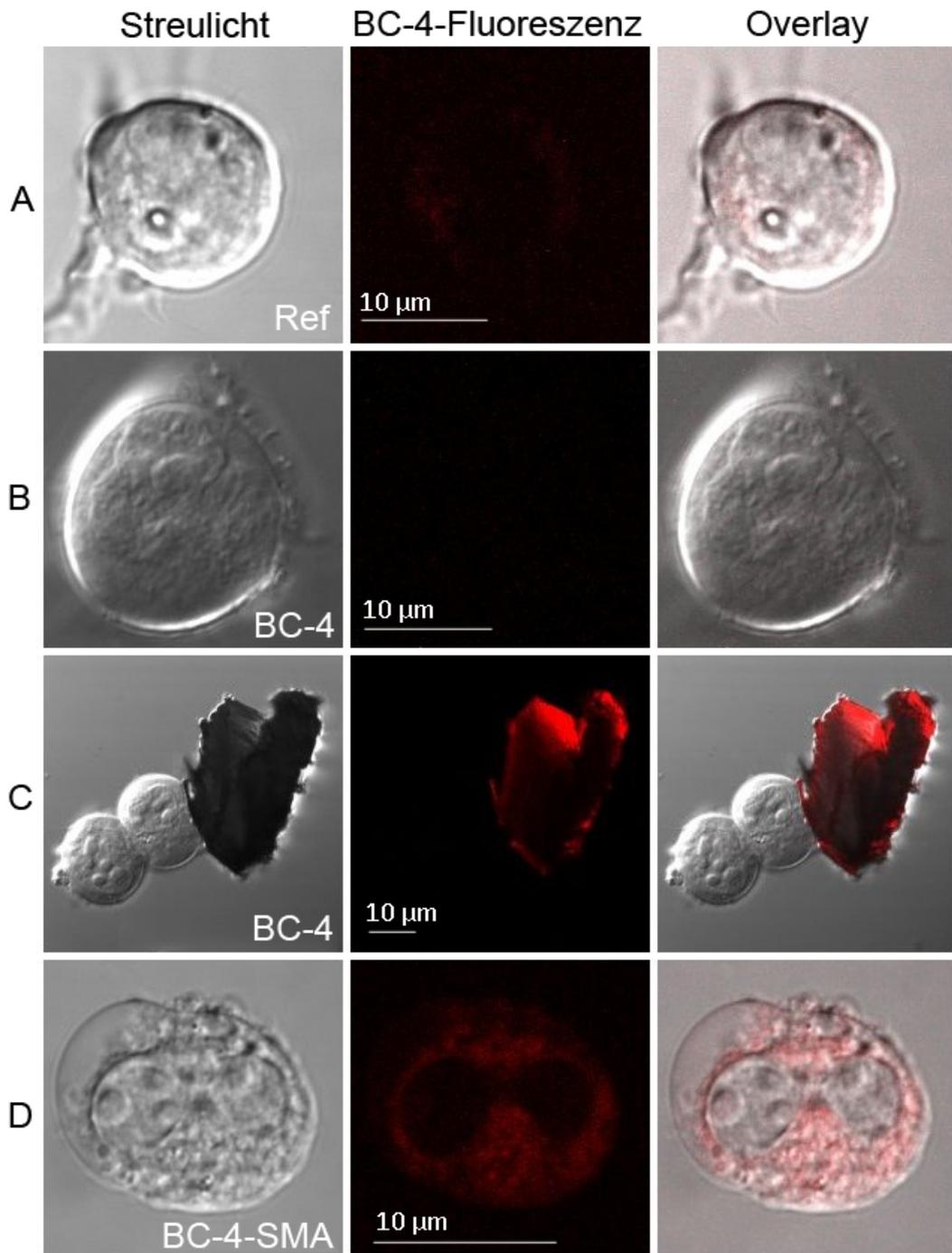
**Bacteriochlorine BC-2 und BC-4 als Photosensibilisatoren** In Hinsicht auf die Anwendung der Moleküle als Photosensibilisatoren in der PDT wurde ein erster biophysikalischer Handversuch durchgeführt. Interessant war nicht nur das expandierte Bacteriochlorin BC-4, sondern auch die Verbindung BC-2, welche eine eher moderate räumliche Verbiegung aufweist und dennoch eine relativ hohe Interkombinationsquantenausbeute von  $\Phi_{ISC} = 0,45$  hat und zudem eine vielversprechende  $^1O_2$ -Generierung ( $\Phi_{\Delta} = 0,40$ ) zeigt.

Untersucht wurden beide Moleküle auf Dunkel- sowie Phototoxizität. Eine kompakte Beschreibung über die experimentellen Einzelheiten findet der Leser im Anhang E. Um eine intrazelluläre Aufnahme der stark hydrophoben Substanzen zu erleichtern, wurde das Bacteriochlorin BC-4 zusätzlich in SMA-Mizellen eingebettet. Die Ergebnisse sind in Abb. 40 zusammengefasst.



**Abb. 40:** MTT-Test zur Phototoxizität: getestet wurden die Bacteriochlorine BC-2 und BC-4. Die Ergebnisse wurden bezüglich der Referenz normiert. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Im Falle von BC-4 wurde ebenfalls eine Probemesung ohne SMA-Mizellen durchgeführt. Dabei betrug die Konzentration von BC-4 im Medium  $3 \mu\text{M}$ . Die Konzentration der Zellen im Medium war etwa  $3,0 \cdot 10^5 \text{ml}^{-1}$ .

Wie man in Abb. 40 erkennen kann, ergab sowohl BC-4 allein als auch das in SMA-Mizellen eingebettete BC-2 keine phototoxische Wirkung. Im Vergleich zum bekannten Chlorin mTHPC war die Phototoxizität jedoch gering. Die Frage, warum es trotz sehr gut geeigneter photophysikalischen Eigenschaften zu keiner effizienten toxischen



**Abb. 41:** Konfokalmikroskopische Aufnahme von HL60-Zellen inkubiert mit BC-4: **A:** HL60-Zellen ohne PS (Referenz), **B-C:** HL60-Zellen inkubiert 24 h mit BC-4, **D:** HL60-Zellen inkubiert 24 h mit BC-4-SMA

Wirkung kam, lässt sich sehr gut mit Abb. 41 beantworten. In dieser konfokalmikroskopischen Aufnahme ist zu sehen, dass Aggregate des BC-4 zum Teil größer werden können als die Zellen.

Das Problem lag offensichtlich darin, dass das Bacteriochlorin BC-4 nicht genügend monomerisiert und somit durch die Zelle nicht einmal aufgenommen werden kann. Die Aufnahme von PS kann durch den Einsatz von Carriern erleichtert werden. Dies wurde hier mit der Einbettung des PS in SMA-Mizellen versucht.

Das entsprechende Overlay-Bild (BC4-SMA) in Abb. 41 zeigt, dass BC-4 aus dem Inneren der Zelle fluoresziert. Die Ergebnisse des Phototoxizitätstests (s. Abb. 40) legen den Verdacht nahe, dass die BC-4-Moleküle nicht ausreichend als Monomere in den Zellen freigesetzt werden. Dies führt uns zu den nächsten Aufgaben, die vorgenommen werden sollten.

**Ausblick** Trotz der vielversprechenden photophysikalischen Eigenschaften des Bacteriochlorins BC-4 würde dieses als PS aufgrund der sehr geringen Phototoxizität nicht in der PDT zum Einsatz kommen. In zukünftigen Untersuchungen sollte nach einem geeigneten Carriersystem gesucht werden, welches ermöglicht, die PS-Moleküle als Monomere in den Zellen freizusetzen. Diese Carriersysteme könnten z.B. Liposome, Nanopartikel oder Dendrimere sein.

In Anbetracht der Tatsache, dass beide Bacteriochlorine ohne den Einsatz von SMA-Mizellen durch die Zelle nicht einmal aufgenommen werden konnten, sollten Phototoxizitätstests mit den strukturell ähnlichen, geladenen Verbindungen in Erwägung gezogen werden. Kationische Bacteriochlorine müssten mit höherer Wahrscheinlichkeit die Zytoplasmamembran durchdringen können[83].

Die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung des Bacteriochlorins BC-5 sollte näher untersucht werden. Hierfür könnten beispielsweise CD-Spektren aufgenommen und ausgewertet werden. Bezüglich der geringen  $^1\text{O}_2$ -Generierung könnte eine Phosphoreszenzmessung Hinweise auf die energetische Lage des  $T_1$ -Niveaus liefern und somit aufklären, ob allein die räumliche Konformation für den geringen Wert verantwortlich ist.

## Literatur

- [1] Bass, Michael *et al.* **Handbook of Optics. Devices, Measurements & Properties.** 2nd ed. Vol II. 1995, McGraw-Hill, Inc.
- [2] J.N. Demas & G.A. Crosby. *The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A review.* The Journal of Physical Chemistry, **Vol. 75**, 8, 1971
- [3] Becker & Hickl GmbH. **The bh TCSPC Handbook.** 2nd ed. September 2006.
- [4] Litwinski, Christian. *Elektronische Eigenschaften von oligonuklearen Phtalocyaninen.* Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation, 2008.
- [5] O'Connor, D.V., Phillips, D.; **Time-correlated Single Photon Counting.** Academic Press. The Royal Institution, London, UK. 1984
- [6] Zeug, André. *Beiträge zur Weiterentwicklung der Transienten Absorptionsspektroskopie zur experimentellen Untersuchung ausgewählter Tetrapyrrole.* Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation, 2002.
- [7] B. Röder. **Einführung in die molekulare Photobiophysik.** B.G. Teubner, Stuttgart-Leipzig. 1999
- [8] W. Demtröder. **Experimentalphysik 3.** Springer 2010
- [9] I. Mikulskas, V. Litvinkij; **PL2143 series Laser-Ultimate Guide. Supplement to instrumental manual.** Vilnius. 2003
- [10] M. Gouterman; *Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings.* in: D. Dolphin **The Porphyrins. Vol. III.** Academic Press, (1978), 1-165
- [11] W. Nolting. **Grundkurs Theoretische Physik 5/2.** Springer 2004
- [12] Menting, Roel. *Lichtinduzierter Energie- und Elektronentransfer in komplexe Bausteinen für artifizielle Photosynthesesysteme.* Humboldt-Universität zu Berlin, Diplomarbeit, 2010.
- [13] B. Röder. *Einführung in die molekulare Photobiophysik.* Vorlesung, 2010
- [14] P.G. Seybold & M. Gouterman. **Porphyrins XIII: Fluorescence spectra and quantum yields.** *J. Mol. Spectroscopy* **31**, 1-13, 1969
- [15] E. A. Ermilov, R. Menting, J.T.F. Lau, X. Leng, B. Röder, D.K.P. Ng; *Switching the photoinduced processes in host-guest complexes of  $\beta$ -cyclodextrin-substituted silicon(IV) phtalocyanines and a tetrasulfonated porphyrin.* in *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 17633-17641
- [16] D. Magde, R. Wong, P. Seybold; *Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamin 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields,* Photochem. and Photobiol., 2002, 75(4): S. 327-334

- [17] E. Reddi & G. Jori; *Steady state and time-resolved spectroscopic studies of photodynamic sensitizers: porphyrins and phtalocyanines*, Reviews of Chemical Intermediates, **10** (1988) S. 241-268. Amsterdam
- [18] Dr. rer. Nat. F. Engelke. **Aufbau der Moleküle. Eine Einführung**. B.G. Teubner, Stuttgart-Leipzig. 1985
- [19] J. Michael Hollas. **Modern Spectroscopy**. John Wiley & Sohns, Ltd (2004)
- [20] H. Haken & H. Wolf. **Molekülphysik und Quantenchemie**. Springer 2006
- [21] F. H. Blum, *Photodynamic Action and Diseases Caused by Light*. American Chemical Society, Monograph **85**, Revised Edition (1964). Haffner, New York.
- [22] A. A. Krasnovsky Jr.; *Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen. History of Development and the Modern Status of Research*, Review. Biochemistry (Moscow), 2007, Vol. 72, **10**, s. 1065-1080
- [23] C. S. Foote, *Mechanisms of Photosensitized Oxidation*, Science, Vol. 162, **3857**, s. 963-970 (1968)
- [24] R. Bonnet, *Photosensitizers of the Porphyrin and Phtalocyanine Series for Photodynamic Therapy*, Chem. Soc. Rev. 1995, **24**, s. 19-33
- [25] S. J. Strickler & R. A. Berg, *Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules*, J. Chem. Phys., Vol. 37, **4** (1962)
- [26] D. L. Dexter, *A Theory of Sensitized Luminescence in Solids*, J. Chem. Phys., Vol. 21, **5** (1953)
- [27] I. Kruk *et al.*, *Formation of active oxygen species during autoxidation of DOPA*, Chemosphere, Vol. 39, **3**, s. 443-453 (1999)
- [28] P. D. Mascio, S. Miyamoto, *et al.* *Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation*, IUBMB Life, 2007 Apr-May; **59** (4-5): 322-31
- [29] B. Halliwell & J. M. C. Gutteridge; *et al.* *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*, Review. *Biochem. J.*, (1984) **219**, 1-14
- [30] D. R. Kearns, *Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen*, Chemical Reviews, (1971) Vol. 71, **4**, 395-427
- [31] C. Schweitzer & R. Schmidt; *Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen*, Chemical Reviews, (2003) Vol. 103, **5**, s. 1685-1757
- [32] Schlothauer, Jan. *Zeitaufgelöster Nachweis von Singulett-Sauerstoff* Humboldt-Universität zu Berlin, Diplomarbeit, 2009.
- [33] Bornhütter, Tobias. *Optimierung, Erweiterung und Erprobung eines Flash Photolyse Messaufbaus* Humboldt-Universität zu Berlin, Masterarbeit, 2010.

- [34] Perna, Tobias. *Untersuchungen zum Einsatz von LEDs als Anregungslichtquellen im vorhandenen Messaufbau zum Nachweis der  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz in vitro* Humboldt-Universität zu Berlin, Bachelorarbeit, 2011.
- [35] C. S. Foote & E. L. Clenman *Properties and Reactions of Singlet Dioxygen* in: C. S. Foote, *et al.* **Active oxygen in chemistry** SEARCH Series, Vol. 2, s. 105-140 (1995)
- [36] W. Spiller, H. Kliesch, D. Wöhrle, S. Hackbarth, B. Röder, G. Schnurpfeil; *Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions*. 1998, *J. Porphyrins Phtalocyanines*, Vol. 2, s. 145-158
- [37] E. Sterberg, D. Dolphin, C. Brückner; *Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy* *Tetrahedron* **54** (1998), s. 4151-4202
- [38] D. J. Willock. **Molecular Symmetry** Wiley, (2009)
- [39] L. Samankumara, M. Zeller, J.A. Krause, C. Brückner; *Syntheses, structures, modification and optical properties of meso-tetraaryl-2,3-dimethoxychlorin, and two isomeric meso-tetraaryl-2,3,12,13-tetrahydroxybacteriochlorins*. in *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 1951-1965
- [40] C. Brückner, J.R. McCarthy, H.W. Daniell, Z.D. Pendon, R.P. Ilagan, T.M. Francis, L. Ren, R.R. Birge, H.A., Frank; *A spectroscopic and computational study of the singlet and triplet excited states of synthetic  $\beta$ -functionalized chlorins*. *Chemical Physics* **294** (2003), s. 285-303
- [41] W. Flitsch; **Hydrogenated Porphyrin Derivatives: Hydroporphyrins**. in *Advances in heterocyclic chemistry*, **43** (1988) 73
- [42] D. Haina, M. Landtheler, O. Braun-Falco, W. Waidelich; in: **Optoelektronik in der Medizin** (Hrsg: O. Waidelich), Springer, 1984, s. 187
- [43] Busse, Ann-Christin. *Effekte von Hypericin auf humane renale Karzinomzellen in vitro*. Georg-August-Universität zu Göttingen, Dissertation, 2009.
- [44] Jamil, Basil. *Elektronenspinresonanz-Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff-Generierung verschiedener Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie*. Charité Universitätsmedizin Berlin, Dissertation, 2004.
- [45] Chou, *et al.*; *Evidence on the  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  Dimol-Sensitized Luminescence in Solution*. in *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4883-4884
- [46] M.C. De Rosa, R.J. Crutchley; *et al.*; *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. in *Coordination Chemistry Reviews* 233-234, (2002), 351-371
- [47] G. Porter *et al.*; *Metal phtalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen*. in *Coordination Chemistry Reviews* 44, (1982), 83-126
- [48] C. Brückner, *et al.*; *Helimeric Porphyrinoids: Stereostructure and Chiral Resolution of meso-Tetraarylmorpholinochlorins*. In *J. Am. Chem. Soc.*, (2011), *33*, 8740

- [49] M.H. Perrin, M. Gouterman, C.L. Perrin; *Vibronic Coupling VI. Vibronic Borrowing in Cyclic Polyenes and Porphyrin*. 1969, *J. Chem. Phys.*, Vol. 50, **10**, 4137-4150
- [50] K. Berlin, E. Breitmaier; *Benziporphyrin, a Benzene-Containing, Nonaromatic Porphyrin Analogue*. (1994), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, no. 12, 1246-1247
- [51] M. Stępień, L. Latos-Grażyński; *Benziporphyrins: Exploring Arene Chemistry in a Macrocyclic Environment*. *Acc. Chem. Res.*, (2005), **38**, 88-98
- [52] S. Oelckers, T. Hanke, B. Röder; *Quenching of singlet oxygen in dimethylformamide*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **132** (2000) 29-32
- [53] S.A. Gerhardt, J.W. Lewis, J.Z. Zhang, R. Bonnet, K.A. McManus; *Photophysical behaviour of an opp-dibenzoporphyrin (2,12-diethyl-3,13-dimethyldibenzo[g,q]porphyrin) in micelles and organic solvents*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, **2**, 934-938
- [54] A. Vincent. **Molecular symmetry and group theory** Wiley, (2001)
- [55] I.S. Dmitriev. **Symmetrie in der Welt der Moleküle** VEB, Leipzig. (1987)
- [56] W.T. Simpson; *On the Theory of the  $\pi$ -Electron System in Porphines*. *J. Chem. Phys.*, Vol. 17, **12**, (1949), 1218-1221
- [57] M. Gouterman; *Spectra of Porphyrins*. *J. Mol. Spectrosc.* (1961), **6**, 138-163
- [58] B. Röder, M. Büchner, I. Rückmann, M.O. Senge, *Correlation of photophysical parameters with macrocycle distortion in porphyrins with graded degree of saddle distortion*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, **9**, 1152-1158
- [59] M. Gouterman; *Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin*. *J. Chem. Phys.*, (1959), Vol. 30, **5**, 1139-1161
- [60] H.C. Longuet-Higgins, C.W. Rector, J.R. Platt; *Molecular Orbital Calculations on Porphine and Tetrahydroporphine*. *J. Chem. Phys.*, Vol. 18, **9**, (1950), 1174-1181
- [61] W. Moffitt, *The Electronic Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons*. *J. Chem. Phys.*, Vol. 22, **2**, (1954), 320-333
- [62] Matthias O. Senge, *Highly Substituted Porphyrins*. In: K. Kadish *et al.* **The Porphyrin Handbook**. Academic Press, Vol. 1 (2000), 239-335
- [63] A.A. Krasnovsky, Jr., K.V. Neverov, S. YU. Egorov; *Photophysical studies of Pheophorbide a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminiscence*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **5**, (1990), 245-254
- [64] J.C. Koziar, D.O. Cowan; *Photochemical Heavy-Atom Effects*. *Acc. Chem. Res.*, **11** (1978), 334-341
- [65] G. Laustriat, *Molecular mechanisms of photosensitization*. *Biochimie*, **68** (1986) 771-778

- [66] J.R. Lakowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, (1999)
- [67] L.R. Milgrom, **The colours of Life. An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds**. Oxford University Press (1997)
- [68] H. Scheer, *An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*. In: B. Grimm, *et al.*; **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls**. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol. 25, Springer, 2006
- [69] M. Jurow, *et al.*; *Porphyryns as molecular electronic components of functional devices*. *Coord. Chem. Rev.*, **254** (2010) 2297-2310
- [70] Korth, Olaf; *Photophysikalische Untersuchungen an Photosynthese-Modellsystemen - Photoinduzierter Elektronentransfer in Lösung und in Langmuir-Blodgett-Filmen*. Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation, 1998.
- [71] N. Wakao, *et al.*; *Discovery of Natural Photosynthesis using Zn-Containing Bacteriochlorophyll in an Aerobic Bacterium Acidiphilium rubrum*, *Plant Cell Physiol.* **37**(6): 889-893 (1996)
- [72] B. Röder, *Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie*. In: **Ange wandte Laser Medizin, Lehr und Handbuch für Praxis und Klinik** eds: LMZ-H.-P. Berlien, G. Müller, Ecomed (1993)
- [73] F. Meyer-Betz; *Untersuchung über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs*. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **112**, (1913) 476-503
- [74] O. Raab; *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien*. *Z. Biol.* (1900) 39:524-546
- [75] C. Cohen-Tannoudji, *et al.*; **Quantenmechanik. Band 1** Walter de Gruyter, Berlin (2007)
- [76] A.A. Krasnovsky, *Pathways of chemical evolution of Photosynthesis*. A.N. Bakh Inst. Biochem., Academy of Science of the U.S.S.R. (1974) in: **Origins of Life** Vol. 5 397-404
- [77] D.R. Snelling, (1968) *Chem. Phys. Lett.* **2**, 346-348
- [78] H. Sponer, E. Teller;; *Electronic Spectra of Polyatomic Molecules*. *Rev. Mod. Phys.*, Vol. 13, **2**, (1941), 75-170
- [79] J.R. Platt; *Classification and Assignments of Ultraviolet Spectra of Conjugated Organic Molecules*. *J. Opt. Soc. Am.*, Vol. 43, **4**, (1953), 252-257
- [80] J. Hasegawa, *et al.*; *Theoretical Study of the Excited States of Chlorin, Bacteriochlorin, Pheophytin a and Chlorophyll a by the SAC/SAC-CI Method*. *J. Phys. Chem. B* (1998), **102**, 1320-1326

- [81] C. Weiss; *Electronic Absorption Spectra of Chlorophylls*. in: D. Dolphin **The Porphyrins. Vol. III**. Academic Press, (1978), 211-223
- [82] K.M. Smith, **Porphyryns and Metalloporphyryns**. Elsevier, Amsterdam (1975)
- [83] Persönliche Kommunikation: Prof. Dr. Beate Röder.
- [84] C. Feest *Photophysical characterization and in vitro testing of novel Tetraphenylporphyrin derivatives with respect to their application in Photodynamic Therapy*. Humboldt-Universität zu Berlin, Diplomarbeit, 2009
- [85] A.K. Iyer, K. Greish, J. Fang, R. Murakami, H. Maeda; *High loading nanosized micelles of copoly(styrene-maleic acid)-zinc protoporphyrin for targeted delivery of a potent heme oxygenase inhibitor*. Biomaterials, Vol. 28, **10**, (2007), 1871-1881
- [86] G.P. Moss, *et al.*; *Nomenclature of tetrapyrroles*. Pure & Appl. Chem., Vol. 59, **6**, (1987), 779-832

## A. UV-VIS- und Fluoreszenzspektren

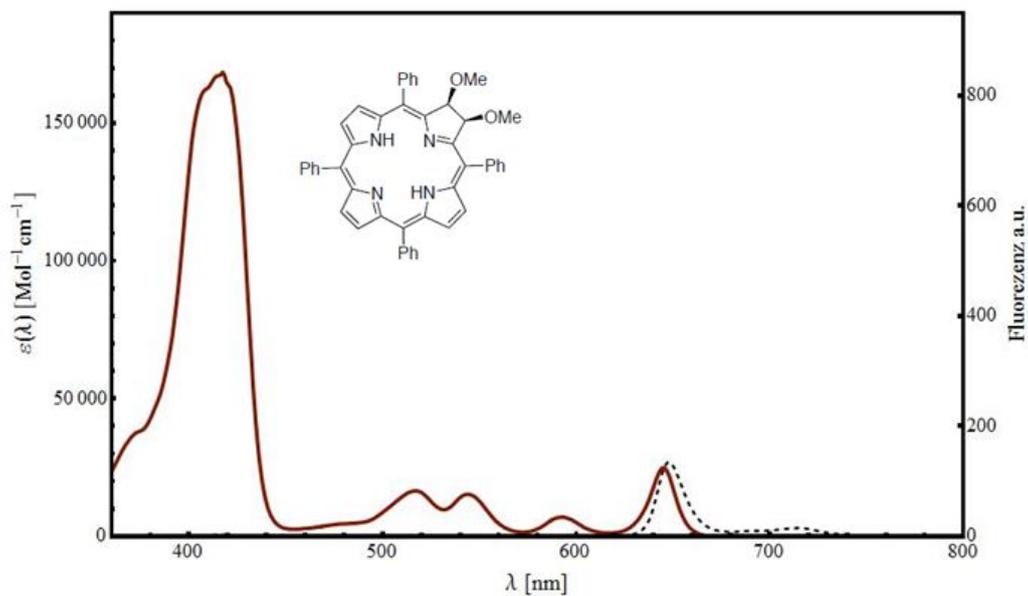


Abb. A.1: Verbindung: C-2. Stokes-Shift:  $\Delta\nu = 89\text{cm}^{-1}$

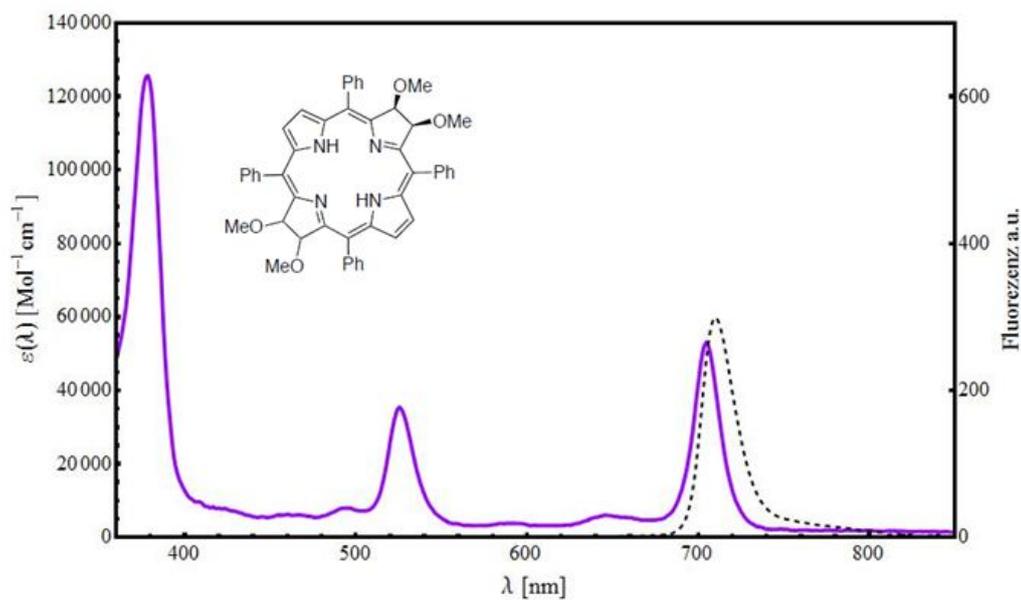


Abb. A.2: Verbindung: BC-2. Stokes-Shift:  $\Delta\nu = 100\text{cm}^{-1}$

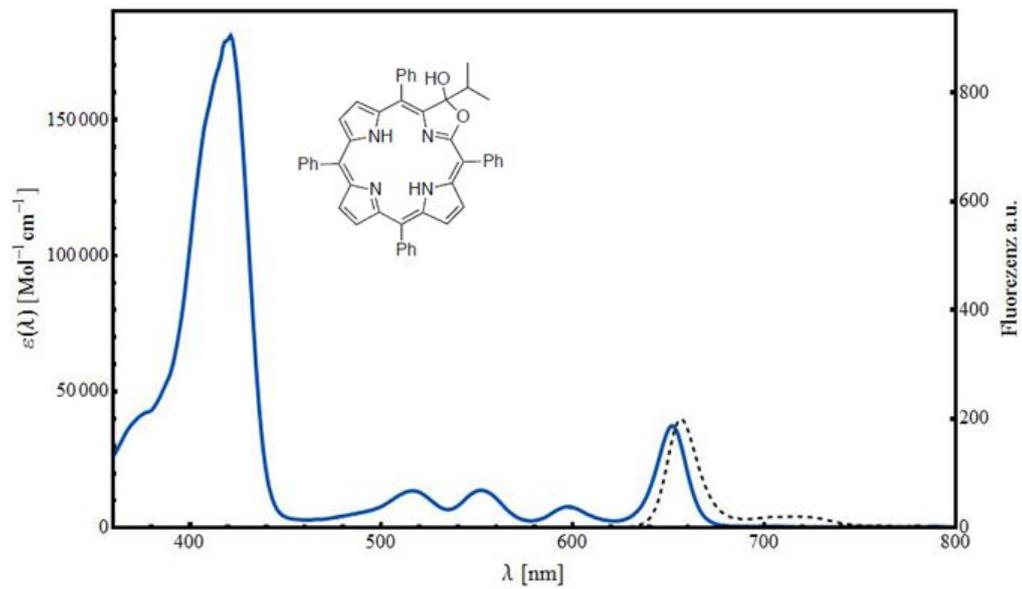


Abb. A.3: Verbindung: C-5. Stokes-Shift:  $\Delta\nu = 110\text{cm}^{-1}$

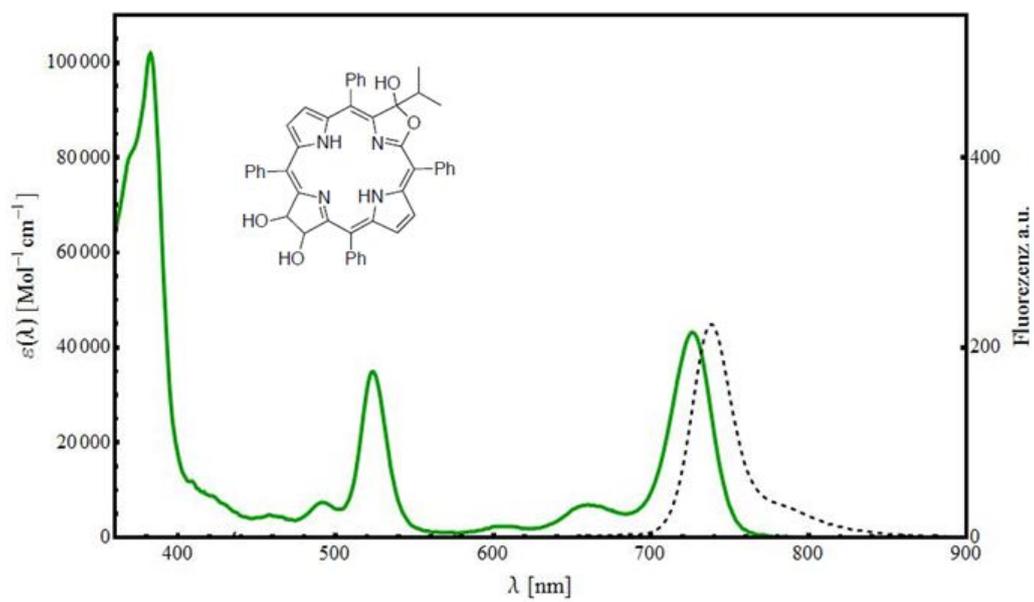


Abb. A.4: Verbindung: BC-6. Stokes-Shift:  $\Delta\nu = 240\text{cm}^{-1}$

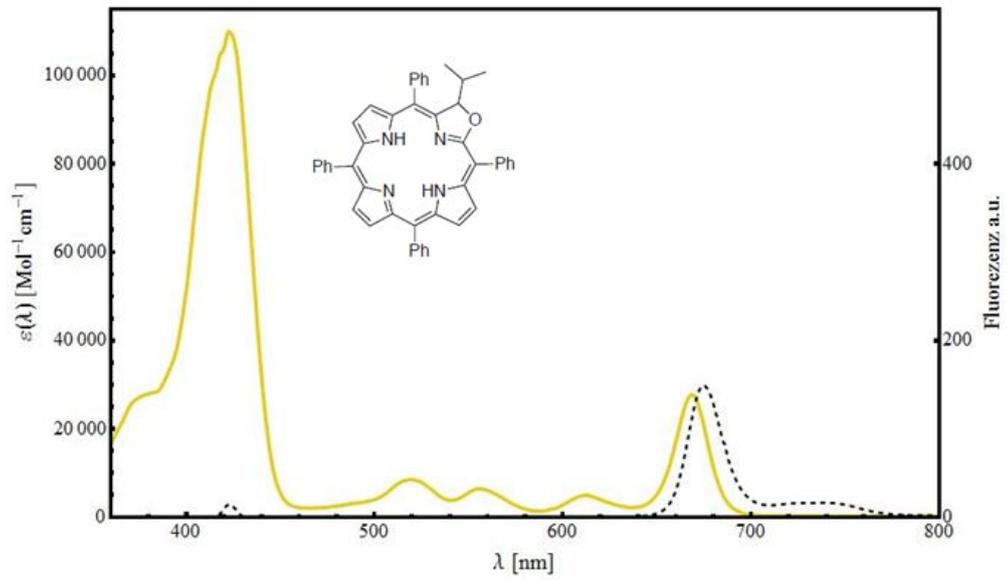


Abb. A.5: Verbindung: C-6. Stokes-Shift:  $\Delta\nu = 157\text{cm}^{-1}$

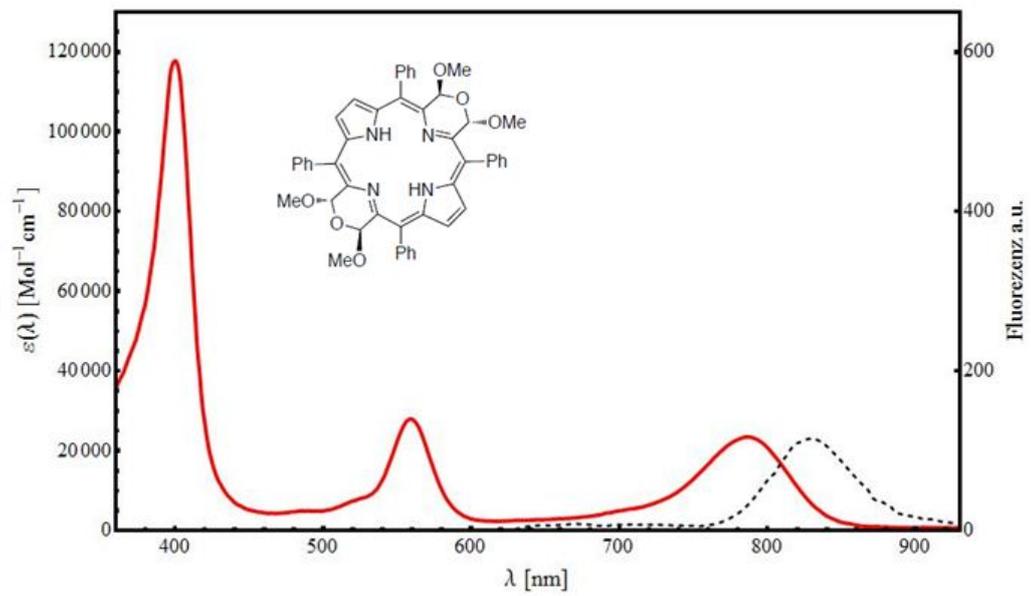


Abb. A.6: Verbindung: BC-5. Stokes-Shift:  $\Delta\nu = 635\text{cm}^{-1}$

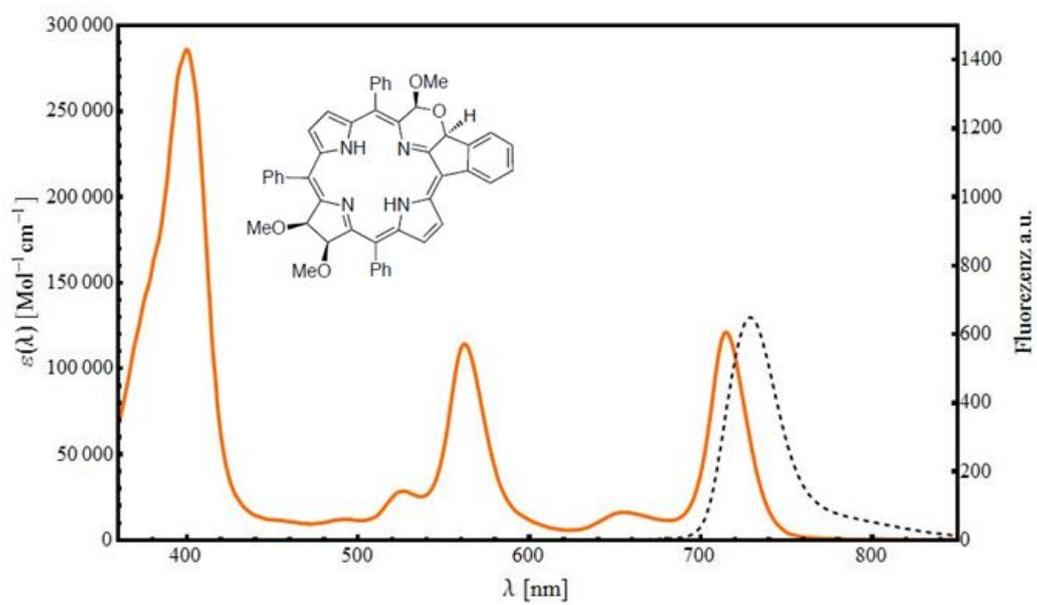


Abb. A.7: Verbindung: BC-4. Stokes-Shift:  $\Delta\nu = 261\text{cm}^{-1}$

## B. Mathematica-Quelltext zum Auswerten von Anregungsspektren

```
<< Statistics'DataSmoothing';
<< NumericalMath'NLimit';
<< Graphics';
<< Graphics'Legend';
<< Graphics'MultipleListPlot';

(* Read correction files - Detector + Lamp *)
Detektor=Import["C:\\Users\\amas\\Documents\\Diplomarbeit\\Fluoreszenz\\KorrekturkurveDet-
Hacky.txt ", "Table"];
LKT=Import["C:\\Users\\amas\\Documents\\Diplomarbeit\\Fluoreszenz\\RoelLK.txt", "Table"];

(* Adapts Detector Correction Curve to the right size of the Spectrum: 400-838.72 nm *)
lDetektor=Detektor[[All, 1]];
mDetektor=Detektor[[All, 2]];
rDetektor=Detektor[[All, 3]];
flDetektor={400}~Join~lDetektor~Join~{838.72, 840.62, 940.16};
fmDetektor={0.000042}~Join~mDetektor~Join~{0.00001000202,0.00001000202, 0.00001000202};
Length[fmDetektor]==Length[flDetektor];
WDek=Transpose[flDetektor, fmDetektor];

(* Adapts Lamp Correction Curve to the right size of the Spectrum: 400-838.72 nm *)
j=LKT~Join~ {{800, 3650}, {838.72, 3618}, {840.62, 3610}, {900,3300}, {940.16, 3240}};

(* Read all ASCII Files & Create an Excitation-Wavelength-List *)
Dateienbc6=FileNames["*.asc"];
AL=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
For[a=1, a<=Length[Dateienbc6], a++, {
AL[[a]]=ToExpression[StringDrop[StringDrop[Dateienbc6[[a]], -4], 6]
}];
WL48=Table[j, {j, 350, 860, 0.5}];

(* Create empty tables *)
Fluobc6 = Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
lbc6=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
rbc6=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
lbc60=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
glattbc6=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
Fluobc6glatt=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
lbc6p=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
rbc6p=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
lbc60p=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
peakbc6=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
Fluobc6gp=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
hole=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
entire=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
ASpek=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
Werte=Table[0, {Length[Dateienbc6]}];
Summebc6=Table[0, {Length[AL]}];
FluoSmoothbc6=Table[0, {Length[AL]}];
IntFbc6=Table[0, {Length[AL]}];
```

(\* Import and integrate for all excitation wavelengths \*)

```
For[k=1, k<= Length[Dateienbc6], k++, {
Fluobc6[[k]]=Import[Dateienbc6[[k]], "Table"];
lbc6[[k]]=Take[Fluobc6[[k]][[All, 2]], {410, 580}];
rbc6[[k]]=Take[Fluobc6[[k]][[All, 1]], {410, 580}];
lbc60[[k]]=lbc6[[k]] /. x_> /; x < -16 -> 0;
glattbc6[[k]]=Transpose[{rbc6[[k]], lbc60[[k]]}];
Fluobc6glatt[[k]]=Join[Take[Fluobc6[[k]], {1, 409}],
  glattbc6[[k]], Take[Fluobc6[[k]], {581, Length[Fluobc6[[k]]}]];
lbc6p[[k]]=Take[Fluobc6glatt[[k]][[All, 2]], {1, 580}];
rbc6p[[k]]=Take[Fluobc6glatt[[k]][[All, 1]], {1, 580}];
lbc60p[[k]]=lbc6p[[k]] /. x_> /; x > 20 -> 0;
peakbc6[[k]]=Transpose[{rbc6p[[k]], lbc60p[[k]]}];
Fluobc6gp[[k]] = Join[peakbc6[[k]], Take[Fluobc6[[k]], {581, Length[Fluobc6[[k]]}]];
hole[[k]]=Drop[Fluobc6gp[[k]], {987, 1006}];
entire[[k]]=Join[hole[[k]], {{860, 0}}];
FluoSmoothbc6[[k]] = Interpolation[ExponentialSmoothing[entire[[k]], 0.06], InterpolationOrder -> 1];
Werte[[k]]=Table[FluoSmoothbc6[[k]][i], {i, 350, 860, 0.5}];
IntFbc6[[k]]=Total[Table[FluoSmoothbc6[[k]][i], {i, 600, 830, 0.5}]];
Summebc6[[k]]=Total[Fluobc6[[k]][[All, 2]]];
ASpek[[k]]=Transpose[{WL48, Werte[[k]]}
  }];
```

(\* Integral over Fluorescence Signal for Excitation Wavelengths 400-838 nm \*)

```
FBC6=Transpose[{AL, IntFbc6}];
```

(\* Spline Function Utility \*)

```
splineF=BSplineFunction[FBC6];
tabF=Table[splineF[i], {i, 0, 1, 0.001}];
smF=Interpolation[ExponentialSmoothing[tabF, 0.058], InterpolationOrder->1];
rF=Table[smF[i], {i, 400, 838, 0.5}];
```

```
splineDek=BSplineFunction[WDeK];
tabDek=Table[splineDek[i], {i, 0, 1, 0.001}];
smDek=Interpolation[ExponentialSmoothing[tabDek, 0.058], InterpolationOrder->1];
rDek=Table[smDek[i], {i, 400, 838, 0.5}];
```

```
splineLK=BSplineFunction[j];
tabLK=Table[splineLK[i], {i, 0, 1, 0.001}];
smLK=Interpolation[ExponentialSmoothing[tabLK, 0.058], InterpolationOrder->1];
rLK=Table[smLK[i], {i, 400, 838, 0.5}];
```

```
Length[rLK]==Length[rDek]==Length[rF]
```

(\* Correction \*)

```
rbc6=rF*rDek/rLK;
Rbc6=rbc6/Max[rbc6];
Alam=Table[i, {i, 400, 838, 0.5}];
Aspektrum=Transpose[{Alam, 1.9*Rbc6}];
Abc6=ListPlot[Aspektrum, PlotStyle->{
  RGBColor[0, 0, 0], Thickness[0.0035]}, Joined->True, PlotRange->All]
```

(\* E N D \*)

## C. DAFS-Spektren

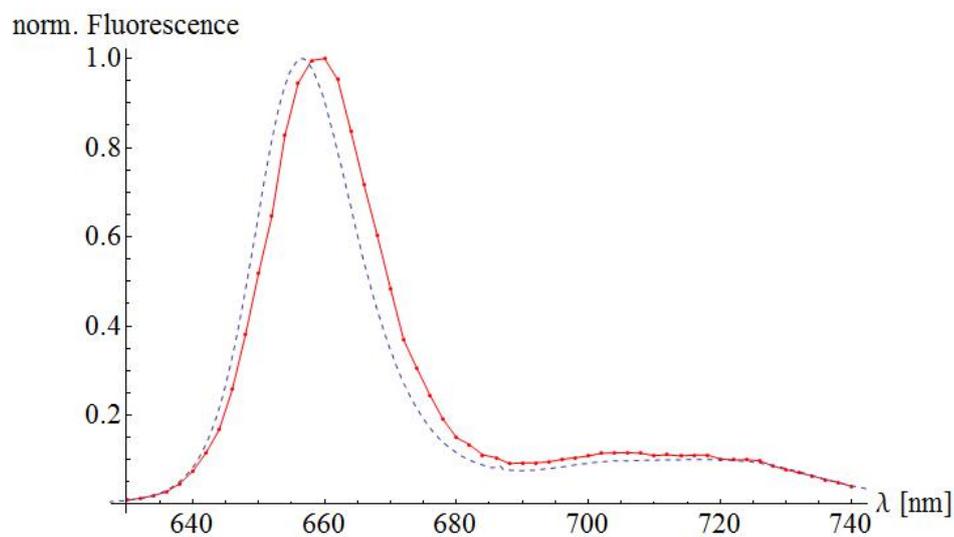


Abb. C.8: DAFS-Spektrum der Verbindung C-5:  $\tau_{Fl} = (6,63 \pm 0,02)ns$

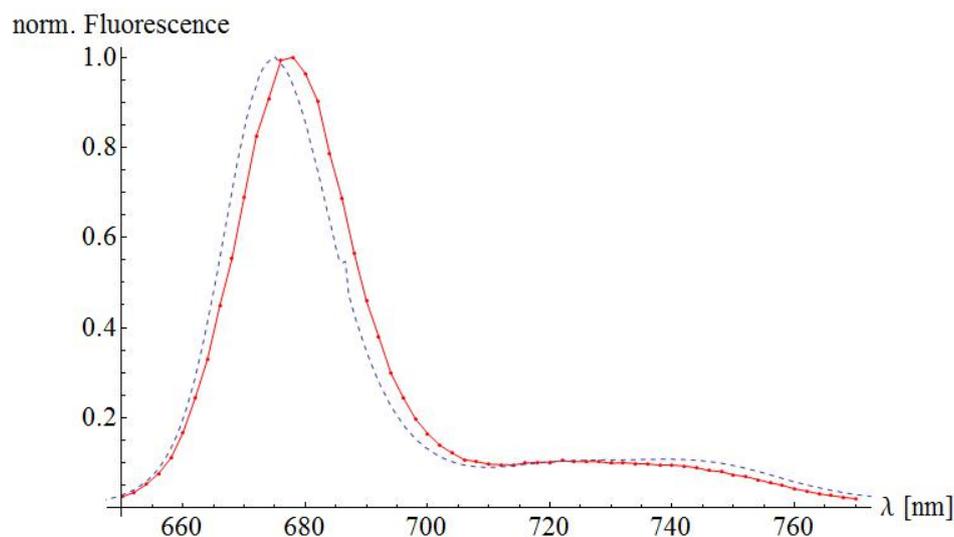


Abb. C.9: DAFS-Spektrum der Verbindung C-6:  $\tau_{Fl} = (6,19 \pm 0,02)ns$

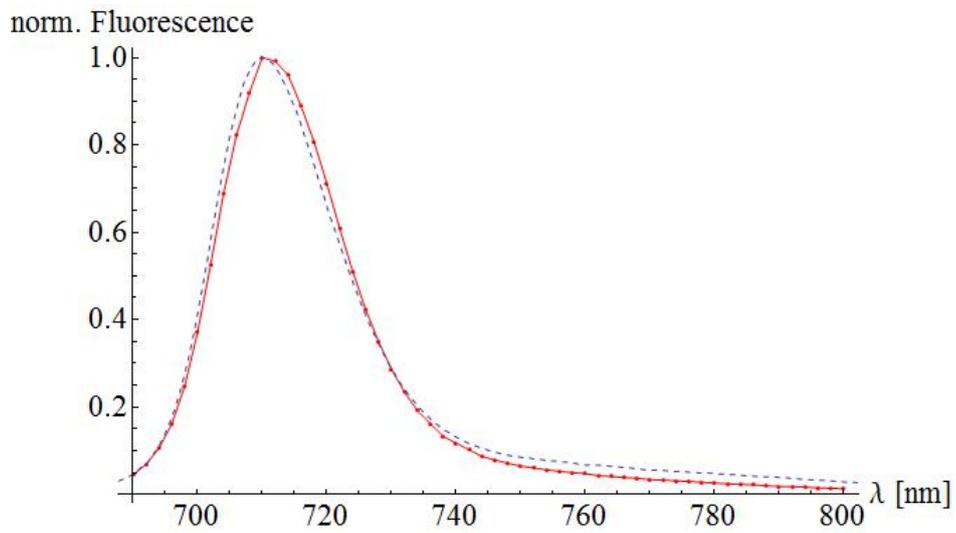


Abb. C.10: DAFS-Spektrum der Verbindung BC-2:  $\tau_{Fl} = (5,13 \pm 0,02)ns$

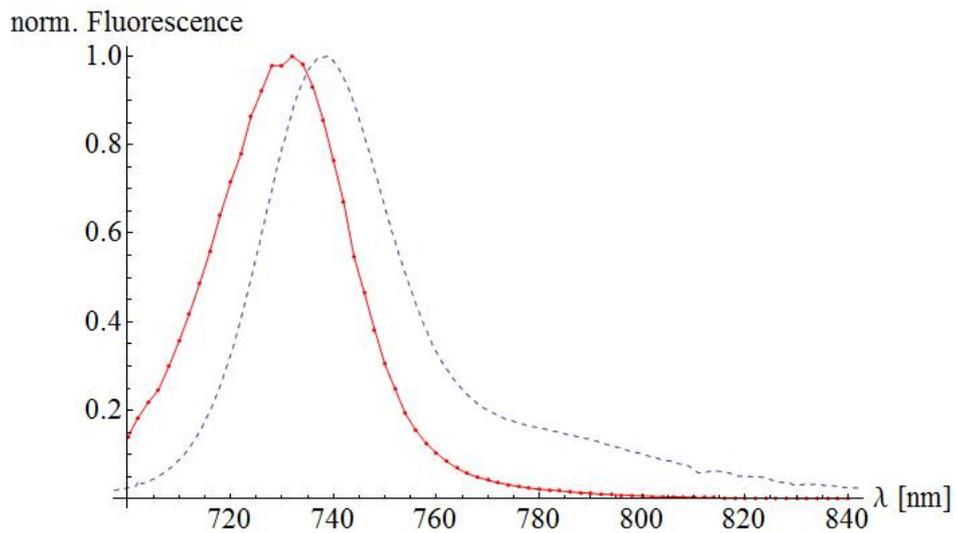


Abb. C.11: DAFS-Spektrum der Verbindung BC-6:  $\tau_{Fl} = (3,19 \pm 0,02)ns$

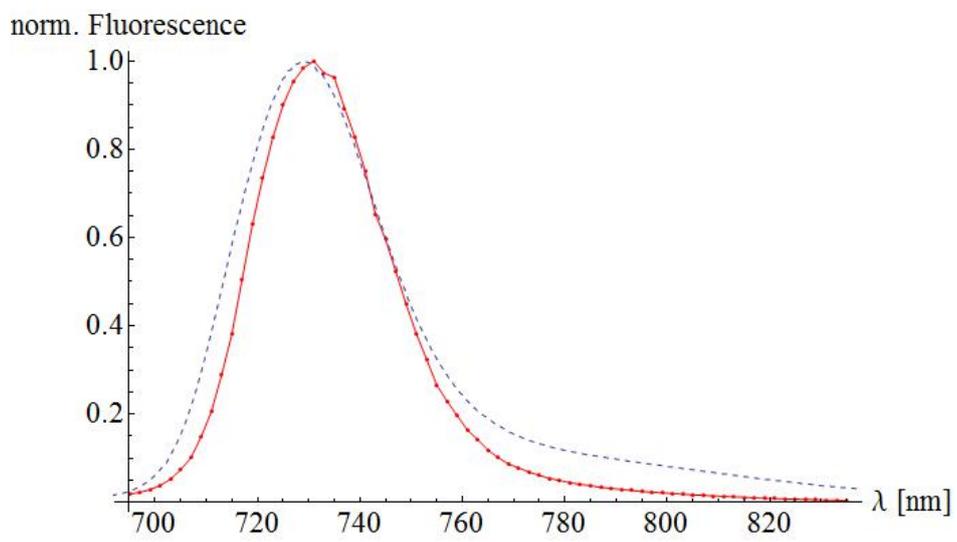


Abb. C.12: DAFS-Spektrum der Verbindung BC-4:  $\tau_{Fl} = (3,90 \pm 0,02)ns$

## D. ps-TAS Spektren

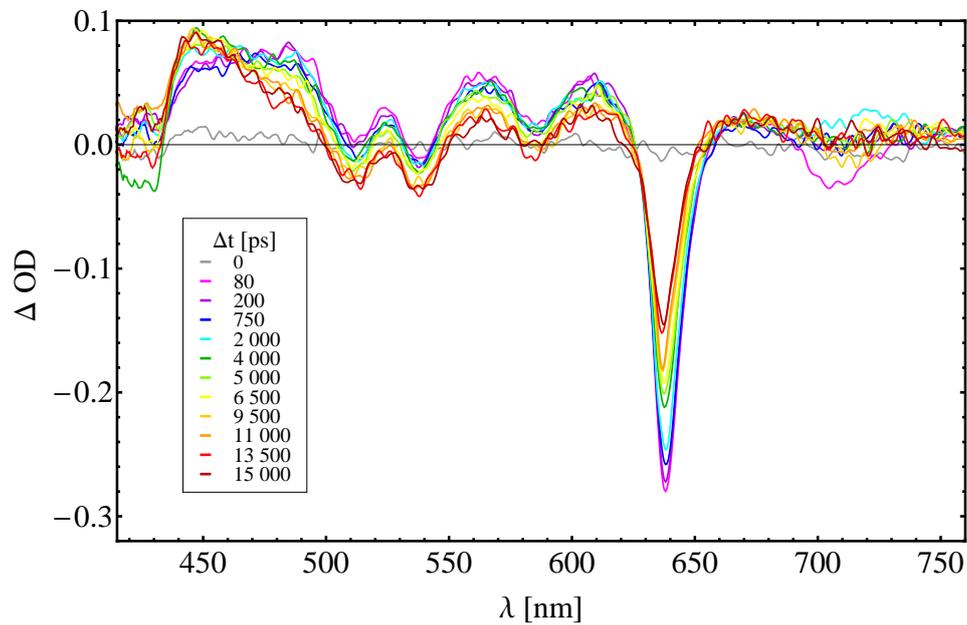


Abb. D.13: ps-TAS-Messung vom Chlorin C-2

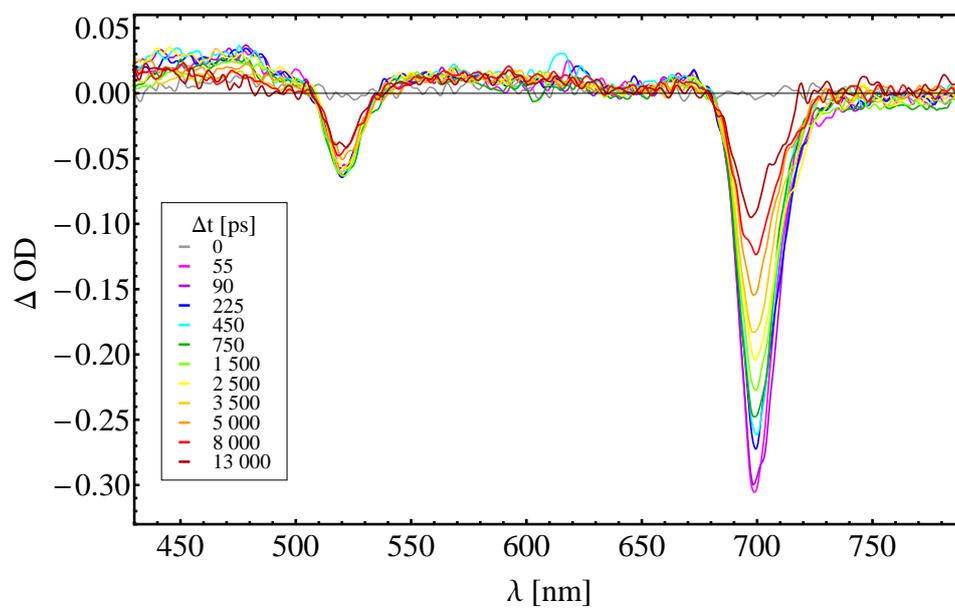


Abb. D.14: ps-TAS-Messung vom Bacteriochlorin BC-2

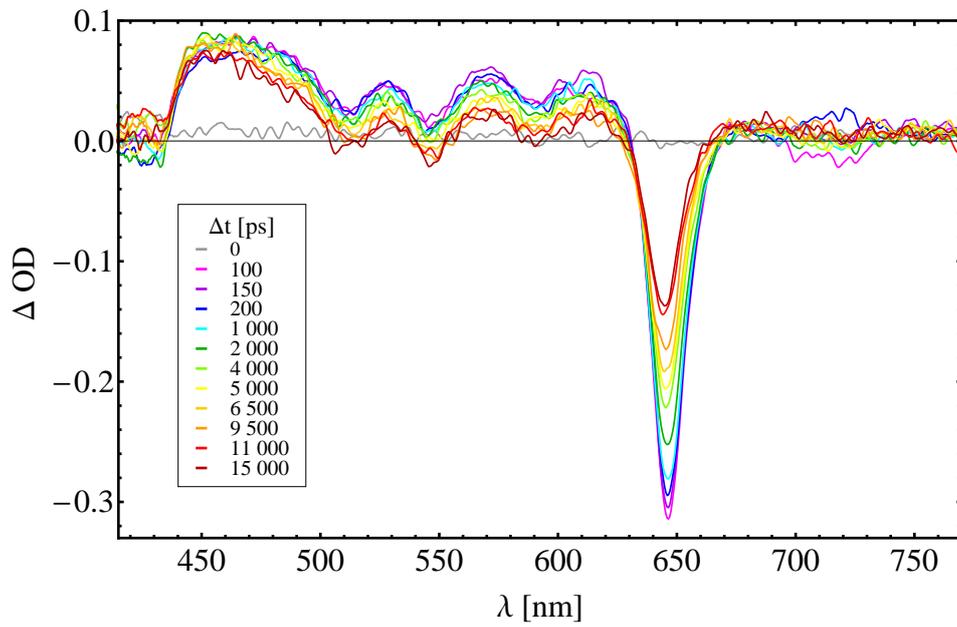


Abb. D.15: ps-TAS-Messung vom Chlorin C-5

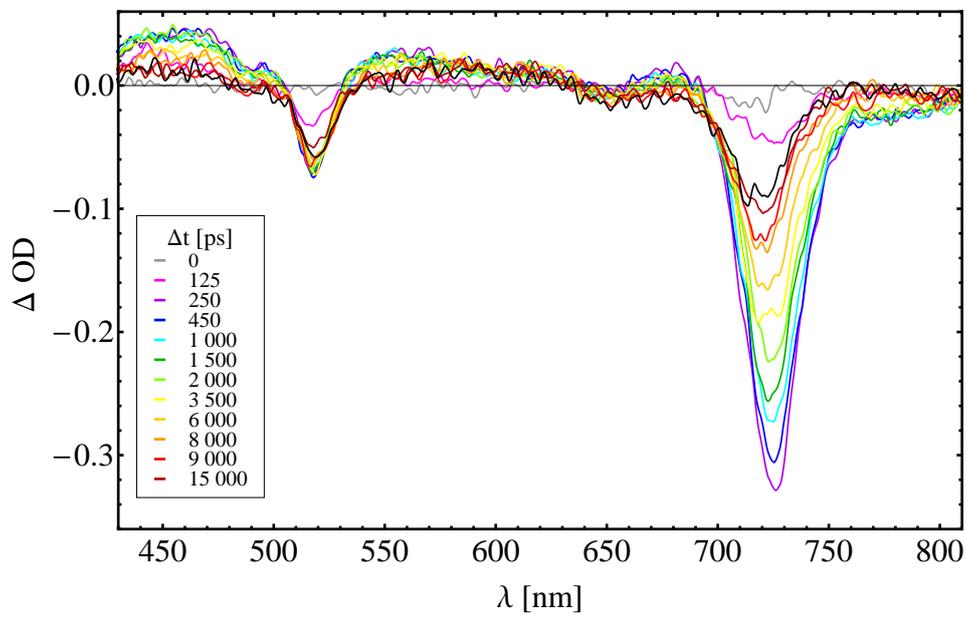


Abb. D.16: ps-TAS-Messung vom Bacteriochlorin BC-6

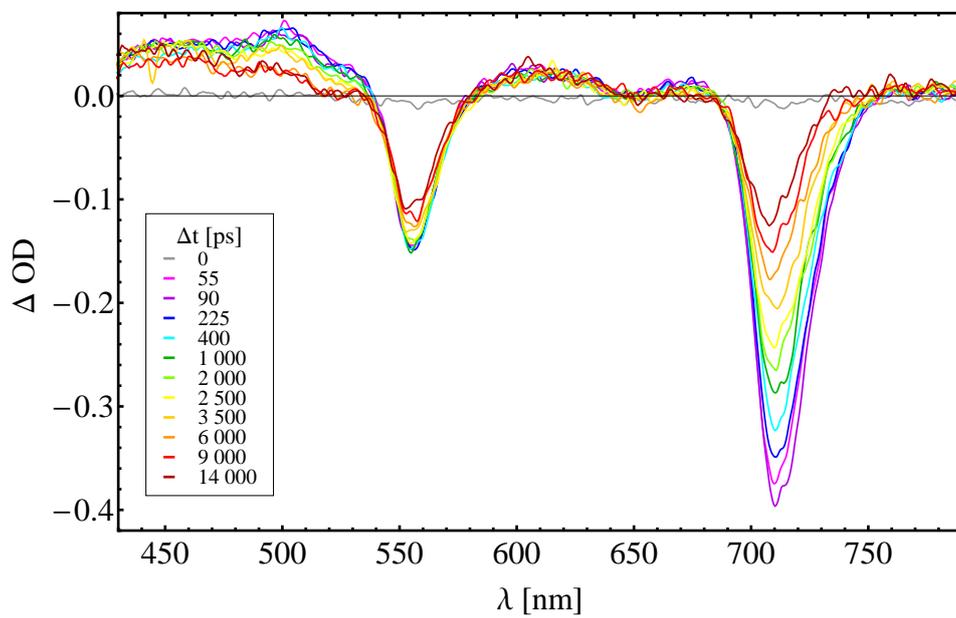


Abb. D.17: ps-TAS-Messung vom Bacteriochlorin BC-4

## E. ESI-Daten des Bacteriochlorins BC-5

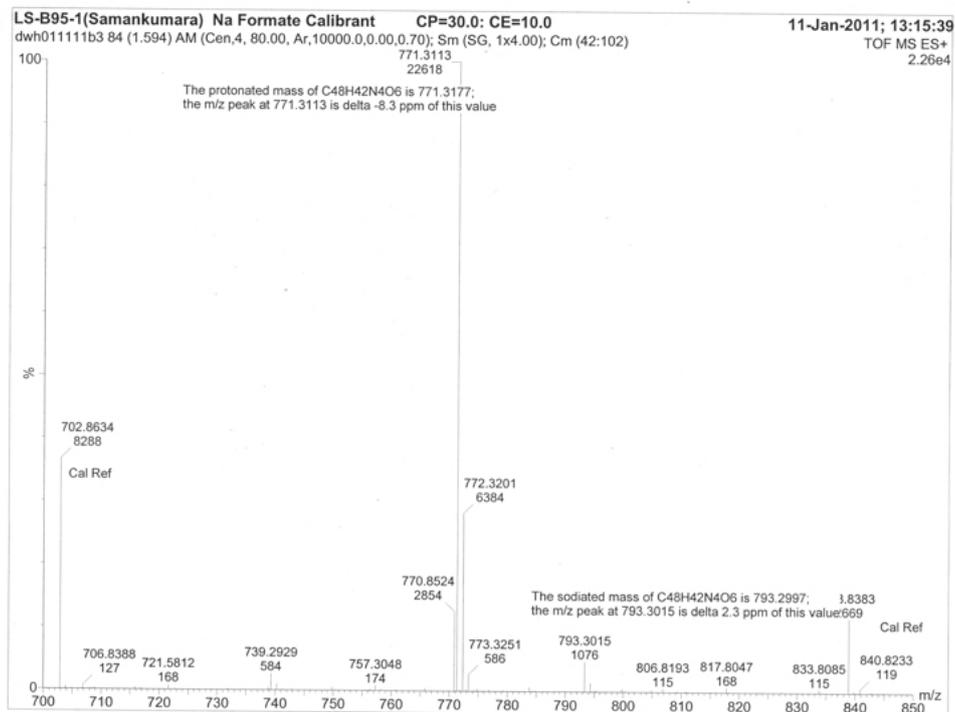


Abb. E.18: ESI-Daten des Bacteriochlorins BC-5 (mit frdl. Gen. von: L. Samankumara und C. Brückner.)

## F. Kultivierung von HL60-Zellen und Inkubation der HL60-Zellen mit Photosensibilisatoren

Die HL60-Zellen werden in T75-oder T25-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wird die Zellsuspension mit frischem Nährmedium (RPMI1640, PAA) auf ca. 200 000 Zellen/ml verdünnt. Mindestens drei Viertel des Gesamtvolumens sollten frisches Medium sein. Wenn die Zellzahl für die Verdünnung zu gering ist, oder eine größere Menge an Zellen gebraucht wird, können die Zellen zentrifugiert (3 min, 350×g) und komplett in frischem Nährmedium aufgenommen werden.

Die Zellzahl wird nach Vitalfärbung eines 100  $\mu$ l-Aliquots mit Trypanblau unter dem Lichtmikroskop mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Trypsinreste brauchen nicht entfernt werden, weil Bestandteile des im Nährmedium enthaltenen FBS (FBS: *fötales bovines Serum*) Trypsin-inhibierend wirken.

Beide Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Für alle Zellversuche werden die HL60-Zellen mit 3  $\mu$ M PS im Medium im Dunkeln inkubiert. Um den Zellen die Aufnahme der sehr hydrophoben PS zu erleichtern wird ein Teil der PS in SMA-Mizellen (SMA: *styrene-maleic acid*) eingebettet[85]. Das Nährmedium wird im Kühlschrank (4°C) gelagert. Vor der Verwendung werden alle Lösungen, Puffer und Nährmedien im Wasserbad auf 37°C temperiert. Alle Arbeiten in der Zellkultur werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die dabei zum Einsatz kommende sterile Werkbank wird vor und nach Gebrauch mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Auch Handschuhe, Pipettierhilfen und andere Materialien, die unter der Sterilbank verwendet werden, werden zuvor mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Sterile Pipettenspitzen und serologische Pipetten werden nur einmal verwendet.

### F.1. Phototoxizitätstest an HL60-Zellen mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay (MTT: (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid*)) wird zur Bestimmung der Viabilität der HL60-Zellen eingesetzt und beruht auf der Umsetzung von wasserlöslichem MTT zu violetter, wasserunlöslichem Formazan durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase. Die Menge an gebildetem Formazan kann nach der Solubilisierung des Formazans in DMSO anhand der Absorption bei 590nm bestimmt werden und ist ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen. Der Assay kann benutzt werden, um die Phototoxizität verschiedener Photosensibilisatoren zu untersuchen, indem nach Bestrahlung die Viabilität der Zellen anhand der Menge an gebildetem Formazan ermittelt wird.

Auf einer 96-well-Platte werden die HL60-Zellen (150  $\mu$ l/well ca. 500000 Zellen/ml) für 24 h im Dunkeln mit 3  $\mu$ M des PS im Medium inkubiert (Inkubator, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit). Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen für 2 min mittels einer weißlicht-LED-Bestrahlungsanlage bestrahlt (für eine ausführlichere Beschreibung siehe [84]). Nach der Bestrahlung inkubieren die Zellen weitere 2 h im Dunkeln.

Zu jeder well-Platte werden nun je 20  $\mu$ l der MTT-Lösung (5 mg/ml) pipettiert. Nach weiteren 2 Stunden Inkubationszeit werden zu jeder Probe 200  $\mu$ l DMSO pipettiert

um die entstandenen Formazankristalle aufzulösen. Die Formazankonzentration in den wells wird mittels des Platereaders (Victor<sup>3</sup>, PerkinElmar) durch Messung der optischen Dichte bestimmt.

## **F.2. Nachweis der intrazellulären Aufnahme der Photosensibilisatoren mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie**

Auf einer 96well-Platte werden die HL60-Zellen ( $150 \mu\text{l}/\text{well}$  ca. 500000 Zellen/ml) für 24 h im Dunkeln mit  $3 \mu\text{M}$  des PS im Medium inkubiert (Inkubator,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 100% Luftfeuchtigkeit).

Zur qualitativen Untersuchung der intrazellulären Aufnahme der PS werden die inkubierten Zellen mittels CLSM (CLSM: *Confocal Laser Scanning Microscopy*) untersucht. Zum Nachweis der PS in den Zellen werden deren Fluoreszenzeigenschaften genutzt.

Die Aufnahmen wurden mit dem CLSM gemacht. Zur Fluoreszenzanregung des PS wurde eine Laserdiode mit 405 nm verwendet. Die Fluoreszenz des PS bei  $\lambda_{em}=650$  nm bis 750 nm beobachtet.

## Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Frau Prof. Dr. Beate Röder bedanken, die mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und diese interessante Arbeit angeboten hat. Ihre ständige Betreuung hat mich regelmäßig ermutigt. Ich kann an keine Frage denken, die nicht ausführlichst diskutiert worden wäre. Ebenso danke ich Dr. Steffen Hackbarth und Dr. Ronald Steffen, die immer freundlich auf meine viele Fragen eingegangen sind. Prof. Christian Brückner danke ich sehr für die Herstellung der hier untersuchten Verbindungen.

Ein besonders großer Dank geht an Dipl. Phys. Roel Menting, der mich in die ps-TAS Anlage eingearbeitet hat und meine Arbeit immer begleitet hat. Vielen Dank auch an Dipl. Phys. Jan Schlothauer sowie M. Sc. Tobias Bornhütter für die Betreuung im *SiSa*-Labor, wo sämtliche Ergebnisse, die Singulett-sauerstoff betreffen, aufgenommen worden sind. Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Annegret Preuß für sämtliche Messungen an HL60-Zellen bedanken. Ich möchte mich ebenso bei Judith Pohl und Dipl. Phys. Sebastian Jungwirth für ihren Einsatz in den letzten Tagen, in denen diese Arbeit dringende Korrekturen brauchte, bedanken. Einen großen allgemeinen Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Photobiophysik für die sehr entspannte Atmosphäre, in der diese Arbeit entstand. Ich danke insbesondere Torsten Wendav, mit dem ich mein Arbeitszimmer teilen und so viele interessante Gespräche führen durfte. Gleichzeitig wünsche ich ihm viel Erfolg bei seiner derzeit noch entstehenden Masterarbeit.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle ebenfalls bei meinen Würzburger Kommilitonen bedanken: David Carreto-Fidalgo, Lena Mandl, Michael Henke, Sabine Kerler, Thomasz Jüngst und Matthias Liemer haben von Anfang an an mich geglaubt und mich pausenlos motiviert. Chango dank ich besonders für die unzähligen Mango-Treffen, manchmal sogar auch zum Frühstück, bei denen wir so vieles besprochen haben. Solche Diskussionen haben mich im Physikstudium zweifellos vorwärts gebracht.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Lena Schall für ihre ständige Unterstützung und ihren engagierten Einsatz bei den sprachlichen Korrekturen, Alain Schmitt, der sich schon immer wie mein eigener Vater verhalten hat und natürlich meiner gesamten Familie, die, wenn auch in der Entfernung, ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums spüren ließ.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine unerlaubten Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe mich anderwärts nicht um den akademischen Grad Diplom-Physiker beworben und besitze den entsprechenden Grad nicht. Ich erkläre die Kenntnisnahme der Studienordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.

Berlin, den 23.01.2011