
Femtosekunden-Fluoreszenzspektroskopie photoisomerisierender Moleküle

Bernhard Schmidt



München 2004

Femtosekunden-Fluoreszenzspektroskopie photoisomerisierender Moleküle

Bernhard Schmidt

Dissertationsschrift
angefertigt an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Bernhard Schmidt
aus Blasendorf

München, den 1. Dezember 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Josef Wachtveitl

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 2005

The Guide is definitive.
Reality is frequently inaccurate.

(Douglas Adams. The Restaurant at the End of the Universe)

Zusammenfassung

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie stellt einen Zugang zur Dynamik von Molekülen dar. Da schnelle molekulare Vorgänge, wie z.B. Isomerisierungen, innerhalb weniger 100 fs oder sogar darunter ablaufen können, erfordert ihre Untersuchung Techniken, die Zeitauflösungen in diesem Bereich erlauben. Elektronische Meßverfahren erreichen derartige Zeitauflösungen jedoch nicht. Daher wird bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen auf optische Methoden zurückgegriffen. In dieser Arbeit wird der Aufbau und die Weiterentwicklung eines Meßsystems für die zeitaufgelöste Beobachtung von Fluoreszenzspektren molekularer Proben auf der Basis des Kerr-Effekts vorgestellt. Nach Anregung der Proben mit Laserimpulsen im ultravioletten oder sichtbaren Spektralbereich kann bei einer Zeitauflösung von ca. 100 fs gleichzeitig eine Messung über einen sehr breiten Spektralbereich vom nahen Ultravioletten bis ins nahe Infrarote durchgeführt werden.

Auf dieser Grundlage wird die Fluoreszenz einer Reihe von Proben untersucht, die nach optischer Anregung isomerisieren. Es handelt sich hierbei um die Moleküle 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol, Bakteriorhodopsin und Proteorhodopsin.

Das Push-Pull substituierte Azobenzolderivat 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol (NA) isomerisiert nach Photoanregung ebenso wie das unsubstituierte Azobenzol. Trotz stark unterschiedlicher elektronischer Struktur offenbart sich eine erstaunliche Ähnlichkeit in der Dynamik beider Moleküle. Beide Systeme besitzen in der Emission ein ähnliches biphasisches Verhalten. Für NA wurden Zeitkonstanten von 0.08 ps und 0.8 ps und ein verzögerter Anstieg der Fluoreszenz im langwelligen Teil der Spektren bestimmt. Ein Unterschied zu unsubstituiertem Azobenzol besteht in dem um etwa den Faktor drei kürzeren Zeitkonstanten von NA.

Der primäre Schritt im Photozyklus von Bakteriorhodopsin (BR) besteht in der Isomerisierung des Retinalmoleküls, welches als Chromophor dient. Während die Zeitskalen dieser Isomerisierung aus transienten Absorptionsexperimenten bereits bekannt sind, unterliegen die damit assoziierten molekularen Prozesse weiterhin einer kontroversen Diskussion. In den hier durchgeführten Emissionsmessungen wurde neben den bereits bekannten Zeitkonstanten von < 0.15 ps und 0.45 ps für den Fall niedriger Anregungsdichten das erste Mal ein dynamischer Stokes-Shift auf der Zeitskala von 0.2 ps entdeckt. Im Falle hoher Anregungsdichten können die deutlichen Änderungen der zeitaufgelösten Spektren Mehrphotonenabsorptionen zugeordnet werden.

Erst vor kurzer Zeit wurde das Proteorhodopsin (PR) als neues Mitglied der Familie der rhodopsinartigen Proteine entdeckt. Ebenso wie bei BR ist der primäre Schritt des Photozyklus die Isomerisierung seines Retinalmoleküls. Hier wurden zum ersten Mal zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an PR durchgeführt. Es wurde, wie auch bei BR, ein dynamischer Stokes-Shift gefunden. Im Gegensatz zu BR besitzt PR in der Emission jedoch drei Zeitkonstanten von < 0.15 ps, 0.45 ps und 4 ps. Die dritte Zeitkonstante kann mit einem spektral dunklen Zwischenzustand assoziiert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Der Kerr-Schalter	9
2.1	Prinzip des optischen Schalters	9
2.2	Up-Conversion	10
2.3	Funktionsweise des Kerr-Schalters	11
2.4	Experimenteller Aufbau	13
2.5	Wahl des Kerr-Mediums	16
2.6	Charakterisierung des Kerr-Schalters	18
2.7	β -Carotin in Toluol	21
2.8	Zusammenfassung	23
3	Isomerisierung von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol	25
3.1	Photochemie von Azobenzol	25
3.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)- Azobenzol	26
3.3	Erstellung eines Reaktionsmodells	31
4	Untersuchung der Primärreaktion von Bakteriorhodopsin	35
4.1	Übersicht	35
4.2	Fluoreszenzmessung mit niedriger Anregungsdichte	37
4.3	Fluoreszenzmessung mit hoher Anregungsdichte	43
4.4	Zusammenfassende Bemerkung	44
5	Untersuchung der Primärreaktion von Proteorhodopsin	47
5.1	Übersicht	47
5.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung	49
5.3	Zusammenfassende Bemerkung	54
	Abbildungsverzeichnis	55
	Literaturverzeichnis	57
	Lebenslauf	67
	Danksagung	69

1 Einleitung

Seit jeher interessieren sich Menschen für den zeitlichen Ablauf von Ereignissen. Die Menschen des Altertums verwendeten zur Einteilung der Zeit noch Sonnen-, Sand- und Wasseruhren. Der wohl erste Mensch, der sich mit der genaueren Messung von kürzeren Zeitintervallen beschäftigte, war Galileo Galilei [1]. Die von ihm eingesetzten Methoden, wie die Messung seines eigenen Pulses oder von ihm konstruierte Pendeluhren, besaßen laut seiner eigenen Einschätzung die Genauigkeit eines Zehntels eines Pulsschlags. Etwa um dieselbe Zeit wurden die ersten Verbindungen entdeckt, die bei Bestrahlung mit Sonnenlicht sichtbares Licht emittieren. Im Jahr 1565 berichtete N. Monardes, daß Wasser, welches eine bestimmte Holzart (*lignum nephriticum*) enthält, im Sonnenlicht glüht [2]. Im Laufe der Zeit keimte ein immer größer werdendes Interesse an Phänomenen, welche mit der Abstrahlung von Licht verbunden sind, und deren zeitlichem Ablauf auf. Da die Reaktionszeit des menschlichen Auges aber für die Verfolgung schneller Prozesse nicht ausreicht, wurden zu diesem Zweck verschiedene experimentelle Ansätze entwickelt.

Schon 1834 benutzte Wheatstone einen rotierenden Spiegel um die Lebensdauer eines Funkens zu bestimmen [3]. Mit dieser ersten Anwendung einer Schmierbildkamera konnte er zeigen, daß die Existenzdauer einiger Funken kürzer als 10^{-6} s ist. Im Jahr 1858 wurde das erste Phosphoroskop von E. Becquerel gebaut [4–6]. Damit war es möglich, Phosphoreszenzzerfallszeiten bis hinab zu 10^{-3} s zu messen. In seinen Schlierenexperimenten um das Jahr 1867 erzeugte A. Töpler mit einem kurzen Lichtfunken eine Schallwelle, welche er sukzessive mit einem zweiten zeitverzögerten Funken abtastete [7, 8]. Das Prinzip dieser Experimente wird auch heute noch in der zeitaufgelösten Spektroskopie angewandt. Abraham und Lemoine konnten bereits 1899 mit Hilfe einer Kerr-Zelle und eines elektrischen Funkens eine Zeitauflösung von 10^{-8} s demonstrieren [9, 10]. Eine Entladung von Kondensatorplatten aktivierte gleichzeitig eine mit CS_2 gefüllte Kerr-Zelle und eine Funkenstrecke. Der Lichtweg zwischen der Funkenquelle und der Kerr-Zelle war variabel. War die Verzögerungsstrecke länger als ca. 4 m, wurde kein Licht mehr transmittiert. Abraham und Lemoine schlossen daraus, daß der für den Kerr-Effekt verantwortliche Mechanismus schneller als 10^{-8} s ist. Da heute für den Kerr-Effekt in CS_2 eine Antwortzeit von ca. 2 ps ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$) bekannt ist [11], wurde somit in Wahrheit die Dauer des elektrischen Funkens gemessen. Dieses Experiment verwendete als erstes das Prinzip einer variablen Verzögerungsstrecke zur Messung von kurzen Zeitintervallen.

Die Antwortzeit der CS_2 -Kerr-Zelle von 2 ps zeigt bereits, daß molekulare Prozesse - hier die Rotation des CS_2 -Moleküls - sich auf sehr kurzen Zeitskalen abspielen können. Sollen solche Prozesse in Molekülen untersucht werden, erfordert

dies eine Synchronisation dieser Prozesse auf der gleichen Zeitskala. Da sich viele molekulare Prozesse durch Lichtanregung induzieren lassen, kann eine solche Synchronisation durch Anregung der Moleküle mit kurzen Lichtimpulsen erfolgen. Mitte des 20. Jahrhunderts wurden molekulare (photochemische) Vorgänge im Bereich von Milli- bis Mikrosekunden durch Verwendung von Lichtblitzen studiert, die Zeitskala war dabei durch die Dauer der Lichtblitze gegeben. Diese sogenannte Blitzlicht-Photolyse wurde von Norrish und Porter um das Jahr 1950 eingeführt [1, 12, 13]. Sie erhielten dafür 1967 den Nobelpreis für Chemie. Die Zeitauflösung in der Spektroskopie konnte jedoch lange Zeit mangels geeignet kurzer Lichtimpulse nicht über den Bereich von Nanosekunden ($1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$) hinaus gesteigert werden.

Erst in den Jahren nach der Einführung des Lasers im Jahr 1960 wurden wieder größere Fortschritte auf dem Gebiet der zeitaufgelösten Spektroskopie erzielt. Während der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die Konzepte der Güteschaltung (engl. Q-Switch) und der Modenkopplung eingeführt und realisiert. Mit modengekoppelten Lasern erreichte man erstmals Impulsdauern im Bereich von Pikosekunden. Shank und Ippen stellten 1974 den ersten modengekoppelten Farbstofflaser mit Impulsdauern von weniger als 1 ps vor [14]. Während der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die Farbstofflaser durch modengekoppelte Titan-Saphir Laser ersetzt [15]. Mit Hilfe parametrischer Verstärker lassen sich heutzutage Impulsdauern bis hinab zu wenigen Femtosekunden (siehe z.B. [16–18]) erreichen, welche über den gesamten ultravioletten, sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich einstellbar sind (siehe z.B. [19, 20]).

Mit der Entwicklung immer kürzerer Laserimpulse wurde es endlich möglich, auch die schnellsten physikalischen und chemischen Prozesse in Molekülen, welche sich auf der Zeitskala von einigen 10 Femtosekunden ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) abspielen, aufzuklären. Diese Zeitskala ergibt sich aus den Schwingungsperioden molekularer Schwingungen, die eine Art untere Grenze für die Reaktionszeiten darstellen. Die höchsten beobachteten Schwingungsfrequenzen in Molekülen liegen bei ca. 3000 cm^{-1} (siehe z.B. [21]), was einer Periodendauer von ca. 10 fs entspricht. Untersuchungen in diesem Bereich sind daher äußerst wichtig für das Verständnis elementarer chemischer Vorgänge. Für dieses wissenschaftliche Arbeitsgebiet wurde der Begriff ‘Femtochemie’ geprägt. Die Bedeutung dieses Feldes wurde durch die Verleihung des Chemie-Nobelpreises an Ahmed Zewail im Jahr 1999 unterstrichen.

Werden Moleküle durch Lichtabsorption in angeregte Zustände versetzt, so finden dort verschiedene photophysikalische und photochemische Prozesse statt. Nach elektronischer Anregung kommt es in der Regel zu Schwingungsrelaxationen innerhalb des angeregten Zustands. Elektronisch angeregte Zustände können nun strahlend oder nichtstrahlend in andere angeregte Zustände oder den Grundzustand relaxieren. Ebenso kann ein Elektronen- oder Protonentransfer auftreten. Weitere Möglichkeiten der Dynamik angeregter Moleküle sind Isomerisierungen, Torsionen und komplexere Photoreaktionen. Diese Vorgänge sind in der Regel mit Änderungen der optischen Eigenschaften verknüpft, z.B. der Absorption und der Emission. Die zeitliche Verfolgung dieser Änderungen der optischen Eigenschaften kann folglich dazu beitragen,

wertvolle Informationen zur Erklärung der Vorgänge in Molekülen zu gewinnen.

Die am weitesten verbreitete Untersuchungsmethode der Kurzzeitspektroskopie ist die Messung der transienten Absorption. Nach Anregung einer Probe mit einem kurzen Laserimpuls wird die zeitliche und spektrale Absorptionsänderung im Anregungsvolumen mit Hilfe eines ebenfalls sehr kurzen Abtastimpulses verfolgt [1]. Bei transienten Absorptionsexperimenten tragen mehrere Komponenten zur Änderung des Signals bei (Abb. 1.1). Nach Anregung der Probe kommt es zunächst zu einem Ausbleichen des Grundzustandes, d.h. die Absorption im Bereich der Wellenlänge des Anregungsimpulses nimmt ab. Angeregte Zustände können nun auch selbst absorbieren, was zu einer Zunahme der Absorption führt. Dazu kommt noch der Beitrag der stimulierten Emission, welcher wiederum eine Abnahme der Absorption bewirkt.

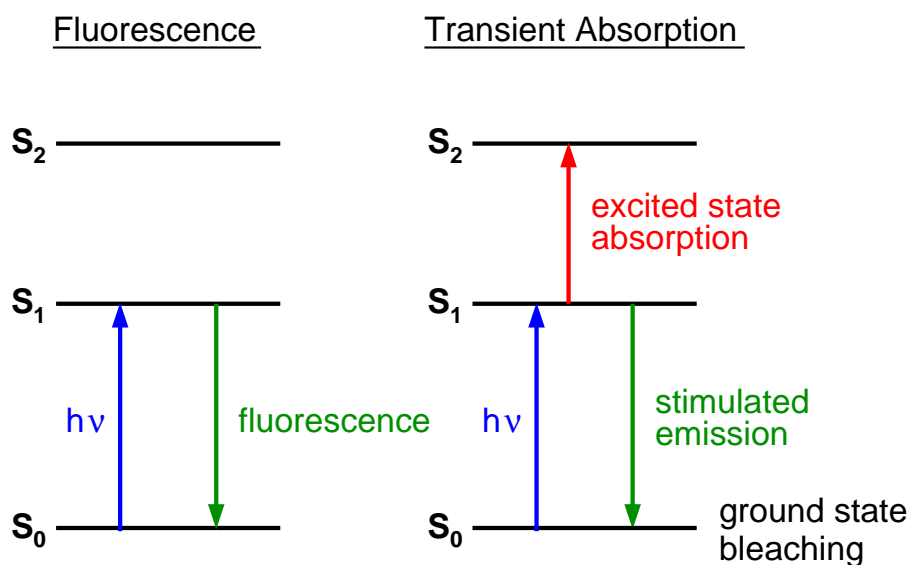


Abbildung 1.1: Signalbeiträge bei Fluoreszenz und transienter Absorption

Der Vorteil dieser Methode ist, daß die gesamte Dynamik eines Moleküls nach Photoanregung abgefragt wird, d.h. Vorgänge in den elektronisch angeregten Zuständen *und* im Grundzustand werden untersucht. Die Separation der Signalbeiträge in zeitaufgelösten Absorptionsspektren ist jedoch unter Umständen nur schwer zu bewerkstelligen, so daß eine eindeutige Zuordnung zu den einzelnen Zuständen oft nicht möglich ist.

Viel einfacher hingegen gestaltet sich die Interpretation von Fluoreszenzspektren. Nach Anregung in einen (meist den ersten) elektronisch angeregten Zustand tritt nur die Emission aus diesem Zustand in niedrigere elektronische Zustände oder den elektronischen Grundzustand auf (Abb. 1.1). Daher spiegelt die Dynamik der Fluoreszenzemission ausschließlich das Verhalten von elektronisch angeregten Zuständen wieder. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ist somit die ideale Technik zum Studium von angeregten Zuständen. Einschränkend muß allerdings er-

wähnt werden, daß die exklusive Beobachtung von elektronisch angeregten Zuständen nur dann gewährleistet ist, wenn bestimmte experimentelle Rahmenbedingungen erfüllt sind. Die spektrale Charakteristik des Fluoreszenzlichts kann durch statische Reabsorption oder durch transiente Absorption in der Probe verändert werden. Es muß daher sichergestellt werden, daß durch diese sogenannten inneren Filtereffekte keine zusätzlichen Absorptionsbeiträge auftreten. Dies wird z.B. durch ausreichende Verdünnung der Probe oder dadurch, daß die Fluoreszenz- und die statischen bzw. transienten Absorptionsbanden spektral nicht übereinander liegen, erreicht.

Auf der experimentellen Seite ergibt sich bei der Messung zeitaufgelöster Emissionsspektren folgendes Problem: Bei der Aufnahme von Fluoreszenzspektren in einem elektronisch gesteuerten Detektor wird das Zeitverhalten des auftreffenden Lichts mindestens über die minimale Antwortzeit des Detektionssystems integriert. Da die Zeitauflösung sämtlicher elektronischer Detektionsverfahren (z.B. Einzelphotonenzählung, Schmierbildkamera) bestenfalls im Bereich von Pikosekunden liegt, ist auf diesem Weg eine Zeitauflösung im Femtosekundenbereich nicht möglich.

Ein Ziel dieser Arbeit ist daher der Aufbau und die Weiterentwicklung eines Meßsystems für die zeitaufgelöste Beobachtung von Fluoreszenzspektren molekularer Proben. Nach Anregung der Proben mit Laserimpulsen im ultravioletten oder sichtbaren Spektralbereich soll bei einer Zeitauflösung von ca. 100 fs gleichzeitig eine Messung über einen sehr breiten Spektralbereich vom nahen Ultravioletten bis ins nahe Infrarote durchgeführt werden. Diese Zielsetzung läßt sich in Form eines sogenannten Kerr-Schalters (siehe auch [22–27]) realisieren, dessen Aufbau und Charakterisierung in dieser Arbeit vorgestellt werden soll.

Zur Interpretation von Emissionsspektren müssen erst einige grundsätzliche Überlegungen angeführt werden. Die Gesamtwellenfunktion Ψ eines Moleküls läßt sich unter der Annahme, daß man die Bewegung der Elektronen (Koordinaten r_i) von der Bewegung der Kerne (Koordinaten R_j) trennen kann, als Produkt eines elektronischen und eines Schwingungsanteils der Kerne schreiben (Born-Oppenheimer Näherung):

$$\Psi = \Psi_{el}(r_i, R_j) \cdot \Psi_v(R_j).$$

Dies wird nahe gelegt durch den großen Masseunterschied, der zu einer viel langsameren Bewegung der Kerne gegenüber der Bewegung der Elektronen führt. In dieser Näherung haben die Geschwindigkeiten der Atomkerne keinen Einfluß auf die elektronische Wellenfunktion Ψ_{el} . Wird weiterhin die parametrische Abhängigkeit der elektronischen Wellenfunktion von den Kernkoordinaten R_j vernachlässigt, so spricht man von der Crude Born-Oppenheimer (CBO) Näherung. Es wird dann die elektronische Wellenfunktion der Gleichgewichtsgeometrie verwendet. Damit hängt nur noch die Kernwellenfunktion Ψ_v von den Kernkoordinaten ab.

Behandelt man in dieser Näherung die Wahrscheinlichkeit eines elektronischen Überganges, dann läßt sich der allgemeine Ausdruck für die Übergangswahrscheinlichkeit

$$|\mu_{if}|^2 = |\langle \Psi_i | er | \Psi_f \rangle|^2,$$

der durch das Quadrat des Übergangsdipolmoments μ_{if} zwischen den beteiligten Zuständen gegeben ist, faktorisieren:

$$|\mu_{if}|_{CBO}^2 = |\langle \Psi_{el,i} | er | \Psi_{el,f} \rangle|^2 \cdot |\langle \Psi_{v,i} | \Psi_{v,f} \rangle|^2.$$

Elektronenübergänge finden dabei so schnell statt ($\sim 10^{-15}$ s), daß sich der Kernabstand während des Elektronensprungs nicht ändert (Franck-Condon Prinzip). Dies wird durch die vertikalen Pfeile in Abb. 1.2 veranschaulicht (Absorption und Emission). Die elektronischen Anteile $|\langle \Psi_{el,i} | er | \Psi_{el,f} \rangle|^2$ werden als elektronische Übergangsmomente, die Schwingungsanteile $|\langle \Psi_{v,i} | \Psi_{v,f} \rangle|^2$ als Franck-Condon Faktoren bezeichnet. Die elektronischen Übergangsmomente sind ein Maß für die gesamte Übergangswahrscheinlichkeit, die Franck-Condon Faktoren beschreiben die relativen Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den einzelnen Schwingungsniveaus der beteiligten Zustände.

Die zeitliche Verfolgung von Emissionsspektren kann neben den Lebensdauern angeregter Zustände, d.h. der Zeitabhängigkeit der spektral integrierten Emissionsintensität, auch wichtige Informationen über die Reaktionen von inter- und intramolekularen Schwingungsfreiheitsgraden auf die elektronische Anregung liefern. Diese äußern sich durch Änderung der spektralen Lage und Form der Emissionsspektren (siehe z.B. Potentialschema in Abb. 1.2). Auf diese Weise können mit Hilfe zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen die Dynamik von Molekülen selbst wie auch ihrer Lösungsumgebung verfolgt werden.

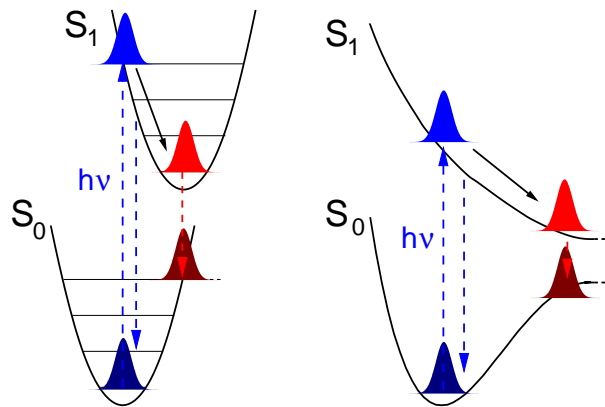


Abbildung 1.2: Potentialschemata für gebundene und reaktive Systeme bei elektronischer Anregung. Nach Anregung von Molekülen in einen elektronisch angeregten Zustand findet innerhalb dieses Zustands Schwingungsrelaxation statt. Dies führt zu einer Änderung der spektralen Lage und Form der Emissionsspektren.

In Systemen mit hoher Fluoreszenzquantenausbeute findet man für die Fluoreszenzspektren eine Art Spiegelsymmetrie zu den zugehörigen Absorptionsspektren. Eine

solche Spiegelsymmetrie kann dann auftreten, wenn die Potentiale des elektronisch angeregten Zustands und des Grundzustands harmonisch genähert werden können, sich die Schwingungsfrequenzen und die Normalmoden in beiden Zuständen nicht wesentlich ändern und der elektronisch angeregte Zustand vor der Emission vibratorisch relaxiert ist (siehe z.B. [28, 29]). Für Systeme, welche eine ultraschnelle Photoreaktion durchlaufen, sind dagegen in ihren zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren die folgenden charakteristischen Eigenschaften zu erwarten:

(i) Aufgrund einer (gedämpften) Bewegung auf der Potentialfläche des elektronisch angeregten Zustands verringert sich die Energielücke zwischen angeregtem Zustand und Grundzustand (Abb. 1.2). Im Laufe der Zeit verschieben sich dadurch die Maxima der Fluoreszenzspektren hin zu größeren Wellenlängen. Solche dynamischen Stokes-Shifts werden sowohl für Systeme mit gebundenen als auch für Systeme mit reaktiven elektronisch angeregten Potentialflächen gefunden. In gebundenen Systemen tritt dieser Effekt oft als Folge der dielektrischen Relaxation der Lösungsumgebung der Moleküle auf [30, 31]. Eine derartige lösungsmittelinduzierte Verschiebung ändert jedoch (abgesehen von einem ν^3 -Faktor [30]) die spektral integrierte Emissionsintensität nicht.

(ii) In reaktiven Systemen kann es zusätzlich noch zu einer spektralen Verschiebung kommen, welche durch eine Bewegung entlang einer reaktiven intramolekularen Koordinate ausgelöst wird. Im Zuge einer solchen Bewegung mit großer Amplitude können sich die Franck-Condon Faktoren für die Emission und bzw. oder die elektronischen Übergangsmomente ändern, was wiederum eine Änderung (in der Regel eine Reduktion) der spektral integrierten Fluoreszenzintensität verursacht [31, 32]. Derlei Intensitätseffekte wurden bereits in einigen Molekülen mit beobachtet. Beispiele sind Azobenzol [33], Nitroaniline [34] und Triarylpyrylium Farbstoffe [32]. Diese experimentellen Befunde sind in Übereinstimmung mit quantenchemischen Rechnungen [34, 35], welche oft eine deutliche Änderung der Übergangsdipolmomente bei Bewegungen entlang reaktiver intramolekularer Koordinaten mit großer Amplitude vorhersagen.

(iii) Schließlich beendet die Entleerung des elektronisch angeregten Zustands das Aussenden von Fluoreszenz. Diese Entleerung kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen, wie etwa durch interne Konversion (internal conversion, IC) in den Grundzustand oder einen niedrigeren elektronischen Zustand, durch Übergang in den Triplett-Zustand (inter system crossing, ISC) oder durch die Entstehung von Photoprodukten.

Bei der Betrachtung der Kinetiken von Molekülen muß also zwischen relaxierten und definierten Zuständen auf der einen und schwingungsangeregten und reaktiven Zuständen auf der anderen Seite unterschieden werden. Nur für relaxierte und definierte Zustände sind die Übergangswahrscheinlichkeiten und somit die Übergangsraten zwischen den beteiligten Zuständen zeitlich konstant und nur im Falle zeitlich konstanter Raten ist die Kinetik der Übergänge exponentiell. Die Anzahl der exponentiellen Zerfälle ist hierbei durch die Anzahl der emittierenden Zustände gegeben. Wird beispielsweise ein Molekül in den niedrigsten elektronischen Zustand

angeregt, so tritt unabhängig von der Anzahl der Übergänge, welche aus diesem Zustand in andere Zustände führen, nur eine einzige Zeitkonstante auf (Abb. 1.3). Erst wenn ein höherer elektronisch angeregter Zustand erreicht wird, sind für die Beschreibung seines Zerfalls in niedrigere elektronisch angeregte Zustände und schließlich in den Grundzustand mehrere Zeitkonstanten notwendig (Abb. 1.3).

In schwingungsangeregten und reaktiven Zuständen ändern sich die Übergangswahrscheinlichkeiten wegen der in (i) und (ii) genannten Vorgänge insbesondere zu frühen Verzögerungszeiten bezüglich ihrer spektralen Verteilung und Amplitude. Die zugehörigen Kinetiken besitzen ein vom exponentiellen Zerfall abweichendes Verhalten. Das spezifische Verhalten in solchen Fällen ist abhängig von den Potentialflächen der beteiligten Zustände und den Anregungsbedingungen und muß für die betreffenden Moleküle jeweils gesondert ermittelt werden.

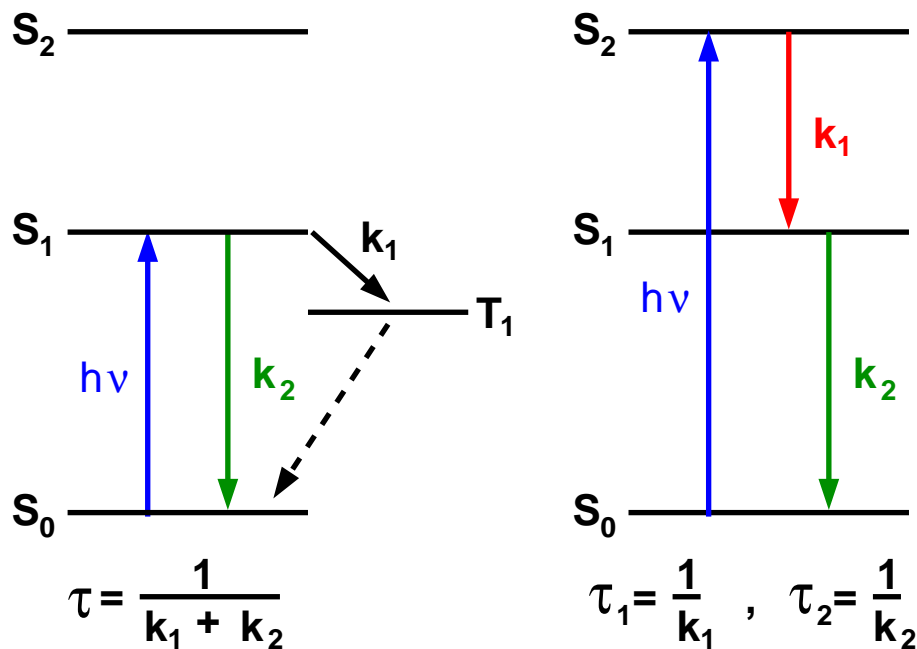


Abbildung 1.3: Zeitkonstanten in einem Ratengleichungsmodell

Der Anpassung der Daten zeitaufgelöster Fluoreszenz- und auch transientser Absorptionsexperimente muß also stets ein kinetisches Modell zu Grunde liegen. Es müssen hierzu Annahmen über die Freiheitsgrade des Systems, die beteiligten Potentialflächen und die daraus resultierende Dynamik gemacht werden. Ein solcher Ansatz für Moleküle, in welchen nach Anregung eine Bewegung mit großer Amplitude stattfindet, ist beispielsweise durch ein System von Diffusionsgleichungen gegeben [32]. Derartige Auswertungen sind jedoch wegen der Unsicherheit der Voraussetzungen nicht immer einfach zu bewerkstelligen. Ein erster Einblick in die Anzahl der beteiligten Vorgänge kann z.B. aus der Singularwertzerlegung (singular value decomposition, SVD) der experimentellen Daten gewonnen werden [36–38].

Häufig erfolgt die Anpassung zeitaufgelöster Daten mit Hilfe von Exponentialfunktionen, obwohl ein Ratenmodell für die Beschreibung der Kinetik der betreffenden Moleküle eigentlich nicht gerechtfertigt ist. Hierfür werden dann in der Regel eine größere Anzahl an Exponentialtermen benötigt, als durch die Anzahl emittierender Zustände erlaubt ist. Obwohl durch eine solche Vorgehensweise die physikalischen und chemischen Vorgänge, welche in den Molekülen stattfinden, nur unzureichend beschrieben werden, wird sie oftmals dennoch benutzt, um einen ersten Überblick zu erhalten.

Auf der Grundlage des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Kerr-Schalter Systems soll die Fluoreszenz einer Reihe von Proben untersucht werden, welche nach optischer Anregung ultraschnelle Photoreaktionen durchlaufen. Einen Schwerpunkt bilden dabei Moleküle, die in Folge einer optischen Anregung isomerisieren. Es handelt sich hierbei um die Moleküle 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol, Bakteriorhodopsin und Proteorhodopsin. Die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen sollen dargestellt und auf der Grundlage der oben gemachten Überlegungen diskutiert werden.

Die vorliegende Arbeit wurde in kumulativer Form erstellt. Den einzelnen Kapiteln liegen die folgenden Veröffentlichungen zu Grunde:

Kapitel 2: B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, and P. Gilch. A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy. *Appl. Phys. B*, 76:809-814, 2003. [siehe Anhang A]

Kapitel 3: B. Schmidt, C. Sobotta, S. Malkmus, S. Laimgruber, M. Braun, W. Zinth, and P. Gilch. Femtosecond Fluorescence and Absorption Dynamics of an Azobenzene with a Strong Push-Pull Substitution. *J. Phys. Chem. A*, 108:4399-4404, 2004. [siehe Anhang B]

Kapitel 4: B. Schmidt, C. Sobotta, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, and P. Gilch. Excited State Dynamics of Bacteriorhodopsin Probed by Broadband Femtosecond Fluorescence Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, accepted. [siehe Anhang C]

Kapitel 5: Die Veröffentlichung der Daten dieses Kapitels ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht erfolgt, befindet sich jedoch in Vorbereitung.

2 Der Kerr-Schalter

Für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen gibt es elektronische Methoden, wie Einzelphotonenzählung (Time Correlated Single Photon Counting, [39]) und Schmierbildkamera (Streakcamera, [39]). Da diese jedoch keine Zeitauflösung im Femtosekundenbereich erlauben, soll hier nicht näher auf sie eingegangen werden. Um eine Zeitauflösung im Bereich von ~ 100 fs zu erreichen, kommen rein optische Methoden zum Einsatz, die auf dem Prinzip eines optischen Schalters (optical gate) basieren.

2.1 Prinzip des optischen Schalters

Im Folgenden soll erst das Prinzip eines optischen Schalters erläutert und dann die Funktionsweise des Kerr-Schalters im Vergleich zu der Up-Conversion Technik dargestellt werden.

In einem optischen Schalter treffen ein Fluoreszenzlichtimpuls und ein kurzer optischer Schaltimpuls aufeinander (Abb. 2.1). Der Schaltimpuls ist dabei um die Zeit t gegenüber dem Fluoreszenzlichtimpuls verzögert. Durch den Schaltimpuls werden die Transmissionseigenschaften des Schalters kurzfristig geändert (Zu- oder Abnahme der Transmission, Abb. 2.2). Das für die Dauer des Schaltimpulses transmittierte Signal sollte proportional zur Intensität des Fluoreszenzlichts zu der gegebenen Verzögerungszeit sein. Das Abtasten der Fluoreszenzintensität entlang der Zeitachse erfolgt durch eine Veränderung der Wegstrecke, welche der Schaltimpuls zu durchlaufen hat. Jede Änderung der vom Schaltimpuls zurückgelegten Strecke Δs bedeutet einen Unterschied in der Laufzeit von $\Delta t = \Delta s/c$ (c = Lichtgeschwindigkeit).

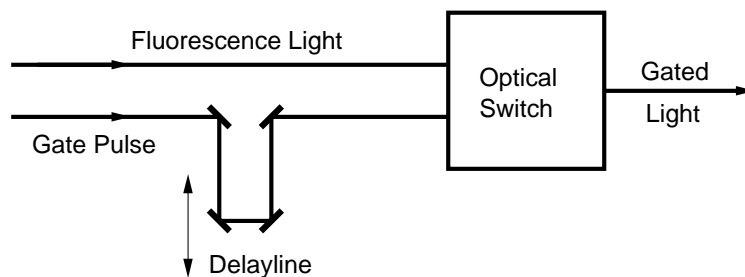


Abbildung 2.1: Prinzip eines optischen Schalters (a)

Das Prinzip eines optischen Schalters ist auf verschiedene Art und Weise realisiert worden. Der bisher gebräuchlichste Ansatz ist die Up-Conversion und soll daher auch

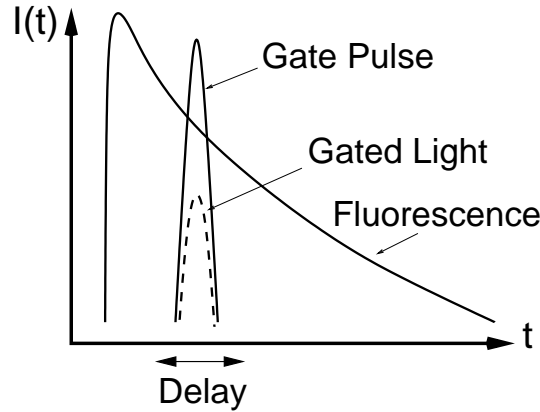


Abbildung 2.2: Prinzip eines optischen Schalters (b)

zum Vergleich mit dem Kerr-Schalter herangezogen werden. Erwähnt werden sollen in diesem Zusammenhang auch noch die Realisierung eines optischen Schalters mit Hilfe des inversen Raman Effekts [40] und der sogenannte Plasma-Schalter [41, 42]. Da die letzteren Methoden jedoch noch keine häufigere Anwendung gefunden haben, wird hier lediglich auf die Literatur verwiesen.

2.2 Up-Conversion

Für die Up-Conversion verwendet man als optischen Schalter einen nichtlinearen Kristall (z.B. beta-Barium Borat = BBO), welcher durch einen kurzen Schalt-Laserimpuls geöffnet wird. Das Fluoreszenzlicht aus der Probe (Frequenz ω_{FL} , Wellenvektor \vec{k}_{FL}) und der Schaltimpuls (Frequenz ω_L , Wellenvektor \vec{k}_L) werden in diesem Kristall fokussiert (siehe Abb. 2.3). \vec{k}_Σ und ω_Σ bezeichnen den Wellenvektor und die Frequenz des Summenfrequenzsignals. Im Falle eines zeitlichen und räumlichen Überlapps beider Impulse findet auf Grund der hohen nichtlinearen Suszeptibilität 2. Ordnung $\chi^{(2)}$ bei optimaler Phasenanpassung $\Delta\vec{k} = 0$ mit $\Delta\vec{k} = \vec{k}_{FL} + \vec{k}_L - \vec{k}_\Sigma$ Frequenzmischung statt und man erhält ein Summenfrequenzsignal $\omega_\Sigma = \omega_{FL} + \omega_L$. Durch diese Beziehungen werden Energie- und Impulserhaltung umschrieben.

Bei festem Kristallwinkel und gegebener Kristalldicke d ist die Phasenanpassung nur für einen geringen Frequenzbereich $\Delta\omega \propto \frac{1}{d} \cdot \left(\frac{c}{v_{Gr}(\omega_\Sigma)} - \frac{c}{v_{Gr}(\omega_{FL})} \right)^{-1}$ erfüllt [43, 44].

$v_{Gr}(\omega)$ ist hierbei die Gruppengeschwindigkeit in einem Medium. Der geschaltete Spektralbereich wird durch Anpassung des Kristallwinkels selektiert. Zur simultanen Schaltung eines großen Spektralbereichs müssen daher ein sehr dünner Kristall mit geringer Dispersion und Schaltimpulse im infraroten Spektralbereich verwendet werden. Auf diese Weise können Spektren mit einer Breite von bis zu 10000 cm^{-1} aufgenommen werden [44]. Es muß bei spektral breitbandiger Up-Conversion jedoch

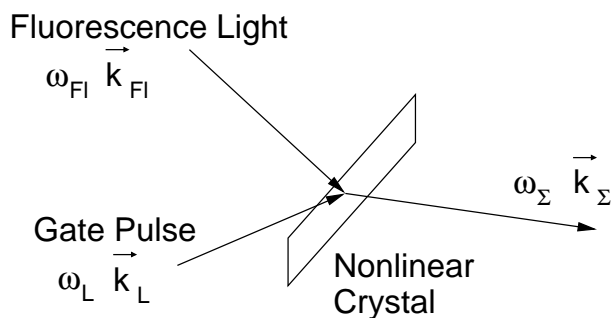


Abbildung 2.3: Prinzip der Up-Conversion

stets darauf geachtet werden, daß die geschalteten Spektren ($\omega_{FL} + \omega_L$) nicht mit den ungeschalteten Spektren (ω_L) überlappen. Es muß weiterhin zur Rücktransformation der in den ultravioletten Spektralbereich transformierten Spektren eine genaue Bestimmung der Transformationseffizienz in Abhängigkeit der Wellenlänge vorgenommen werden.

Die Zeitauflösung wird im wesentlichen von der Länge der Anregungs- und Schaltimpulse und der Dispersion im Aufbau bestimmt. Es können Zeitauflösungen von einigen 10 fs erreicht werden. In der Regel ist die Zeitauflösung jedoch nicht besser als ca. 50-100 fs, da zum einen durch sehr kurze Schaltimpulse (< 30 fs) die spektrale Auflösung sehr schlecht wird und somit spektrale Dynamiken evtl. nicht mehr zu beobachten sind [31] und zum anderen die Schalteffizienz mit der Kristalldicke sinkt. Werden scharf fokussierte Schaltimpulse mit hoher Energie ($\sim 60 \mu\text{J}$) verwendet, können bei einer Kristalldicke von 0.1 mm und einer Zeitauflösung von ca. 80-100 fs Schalteffizienzen von bis zu 10% erreicht werden [44].

2.3 Funktionsweise des Kerr-Schalters

Ein Kerr-Schalter ist wie auch die Up-Conversion ebenfalls eine rein optische Methode, die auf dem Prinzip eines optischen Schalters beruht. Im Gegensatz zur Up-Conversion ($\chi^{(2)}$ -Prozeß) basiert der Kerr-Effekt auf einem Prozeß dritter Ordnung $\chi^{(3)}$ (z.B. [23–25, 27, 45]). Materialien, welche als Kerr-Medium Verwendung finden, sind zur Vermeidung parametrischer Prozesse in der Regel isotrop und damit wird $\chi^{(2)}$ gleich Null. Die nichtlineare Suszeptibilität 3. Ordnung $\chi^{(3)}$, welche proportional zum nichtlinearen Anteil n_2 des Brechungsindex ist, ist bei Einstrahlung eines Laserimpulses der Intensität $I(r, t)$ in folgender Weise mit der zeitlichen Änderung des Brechungsindex $n(I, r, t)$ verknüpft [46]:

$$n(I, r, t) = n_0 + n_2 I(r, t) = n_0 + \Delta n(r, t)$$

$\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$ ist der durch das äußere Feld verursachte Brechungsindexunterschied

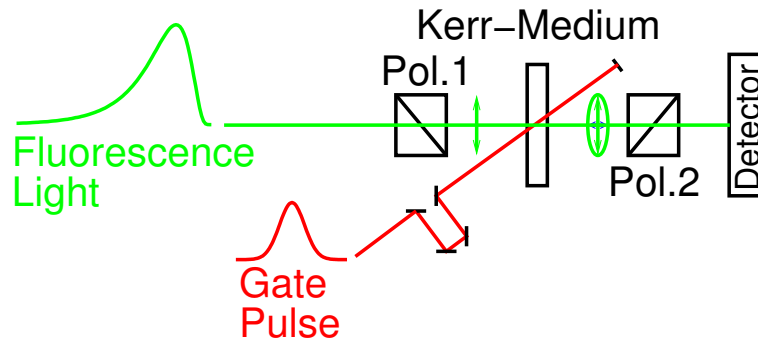


Abbildung 2.4: Prinzip des Kerr-Schalters

zwischen außerordentlichem und ordentlichem Brechungsindex relativ zur Polarisationsrichtung des Laserimpulses.

In einem Kerr-Schalter befindet sich ein isotropes Kerr-Medium zwischen zwei gekreuzten Polarisatoren (Abb. 2.4). Ohne Schaltimpuls kann Fluoreszenzlicht die Polarisatoren nicht passieren, der Kerr-Schalter ist geschlossen. Wird ein intensiver, linear polarisierter Laserimpuls auf das Kerr-Medium fokussiert, wird im Kerr-Medium eine Anisotropie induziert, d.h. das Kerr-Medium wird doppelbrechend, der Kerr-Schalter ist offen. Stehen die Polarisationsrichtungen von Fluoreszenzlicht und Schaltimpuls geeignet zueinander, d.h. optimalerweise unter einem Winkel $\Theta = 45^\circ$, so wird aus der linearen Polarisation des Fluoreszenzlichts eine elliptische Polarisation [46]. Ein Teil dieses Lichts kann nun den zweiten Polarisator passieren und detektiert werden.

Während bei der Up-Conversion der simultan zu schaltende Frequenzbereich durch die Phasen Anpassung vorgegeben ist, entfällt für den Kerr-Schalter diese Beschränkung. Auf Grund des physikalischen Prinzips ist der simultan zu schaltende Frequenzbereich lediglich durch die Transmissionseigenschaften der verwendeten optischen Komponenten beschränkt.

Die Zeitauflösung eines Kerr-Schalters wird im wesentlichen von den Impulsdauern der Anregungs- und Schaltimpulse, der Gruppengeschwindigkeitsdispersion im Aufbau, dem Winkel zwischen Schalt- und Fluoreszenzlicht und den Eigenschaften des Kerr-Mediums bestimmt. Für die Schalteffizienz T , d.h. das Verhältnis von geschaltetem Fluoreszenzlicht pro Zeiteinheit zu dem auf das Kerr-Medium einfallenden Fluoreszenzlicht gilt [25, 47]:

$$T = \sin^2(2\Theta) \cdot \sin^2\left(\frac{1}{2}\varphi(r, t)\right)$$

$\varphi(r, t) = 2\pi\Delta n(r, t)l/\lambda_{Fl}$ ist die im Kerr-Glas induzierte Phasenverschiebung zwischen ordentlichem und außerordentlichem Anteil des elektrischen Feldes des Fluoreszenzlichts der Wellenlänge λ_{Fl} in einem Kerr-Medium der Schichtdicke l . Bei $\Theta = 45^\circ$ kann für kleine Phasenverschiebungen $\varphi(r, t)$ die Schalteffizienz durch

$$T \approx \pi^2 n_2^2 l^2 I_{Schalt}^2 / \lambda_{Fl}^2$$

genähert werden. Die Schalteffizienz eines Kerr-Schalters ist also proportional zum Quadrat der Schaltimpulsintensität I_{Schalt} , dem nichtlinearen Brechungsindex n_2 , der Länge l des Kerr-Mediums und umgekehrt proportional zum Quadrat der Wellenlänge λ_{Fl} .

Obwohl der Kerr-Effekt bereits kurz nach der Einführung der ersten modengekoppelten Laser für die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung im Pikosekundenbereich verwendet wurde [45], wird diese Technik erst seit wenigen Jahren für Messungen im Femtosekundenbereich eingesetzt [23–26]. In der praktischen Realisierung ergeben sich jedoch Probleme, welche einen effektiven Einsatz dieser Technik erschweren. Das Licht der Schaltimpulse wird zum Teil am Kerr-Medium gestreut und erzeugt am Detektor ein Signal, welches um mehrere Größenordnungen höher ist als das geschaltete Fluoreszenzsignal. Dieser Untergrund kann nur durch Einsatz geeigneter Filter unterdrückt werden. Da bisher stets Schaltimpulse mit Wellenlängen von ca. 800 nm (die Fundamentale der Titan-Saphir Lasersysteme) verwendet wurden, konnte Fluoreszenzlicht im nahinfraroten Spektralbereich > 750 nm nicht zeitaufgelöst gemessen werden. Mehrphotonenabsorptionen im Kerr-Medium erzeugen einen intensiven Untergrund über den gesamten sichtbaren Spektralbereich [25]. Dieser führt zu einer deutlichen Reduktion des Signal- zu Rauschverhältnisses. Messungen mit geringer Signalstärke sind auf diese Weise nicht mehr möglich. Die Dispersion der verwendeten optischen Komponenten beeinflusst die Laufzeiten der verschiedenen Wellenlängen eines Fluoreszenzspektrums. Die höherenergetischen blauen spektralen Anteile eines Spektrums werden relativ zu den niederenergetischen roten Anteilen verzögert. Dies führt in Abhängigkeit von der Größe der Dispersion zu einer Verlängerung der Meßzeiten und einer Verschlechterung der Zeitauflösung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kerr-Schalter entwickelt, welcher all diese Einschränkungen nicht mehr besitzt. Für zeitaufgelöste Messungen steht nun ein Detektionsfenster von ca. 350 - 1000 nm zur Verfügung. Durch Verwendung von Schaltimpulsen im nahinfraroten (NIR) Spektralbereich bei ca. 1100 nm wird der im Kerr-Medium entstehende Untergrund weitgehend beseitigt. Der Einsatz reflektiver Optik und dünnschichtiger Breitbandpolarisatoren reduziert die Dispersion auf ein Minimum. Dies führt zu kürzeren Meßzeiten und einer besseren Zeitauflösung. Bei einer Zeitauflösung von < 100 fs ist nun Fluoreszenzspektroskopie an Molekülen, welche ultraschnelle Photoreaktionen durchlaufen, möglich.

2.4 Experimenteller Aufbau

Die folgende Darstellung berücksichtigt einige kleinere Modifikationen gegenüber dem Stand, wie er in [48] beschrieben wurde. Diese Modifikationen zielen zum einen auf die Verbesserung der Zeitauflösung (ursprünglich ca. 130 fs auf heute ca. 90 fs)

und zum anderen auf die Steigerung der spektralen Effizienz im ultravioletten Spektralbereich zwischen 350 nm und 400 nm.

Die für das Experiment verwendeten Femtosekunden-Laserimpulse der Wellenlänge 775 nm werden von einem Clark CPA 2001 Oszillator-/Verstärkersystem erzeugt (CPA = chirped pulse amplifier). Die Pulsdauer beträgt ca. 150 fs (FWHM) bei einer Impulsenergie von ca. 900 μJ und einer Wiederholrate von 1 kHz. Ein Teil der Impulsenergie (ca. 220 μJ) wird zum Betreiben eines zweistufigen nicht-kollinearen optisch-parametrischen Verstärkers (engl. non-collinear optical parametric amplifier = NOPA) verwendet (Abb. 2.5, [16]). Dessen Impulse, deren Wellenlänge über den gesamten sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich einstellbar ist, dienen zur Anregung der Probe. Mit Hilfe eines Quarz-Prismenkompressors ist es möglich, die Impulse bis auf eine Dauer von einigen 10 fs zu komprimieren. Zur Anregung der Proben werden die Impulsenergien in der Regel auf Werte deutlich unter 1 μJ abgeschwächt. Durch Frequenzverdopplung der Impulse in einem dünnen nichtlinearen Kristall (BBO) können Proben auch im ultravioletten Spektralbereich angeregt werden.

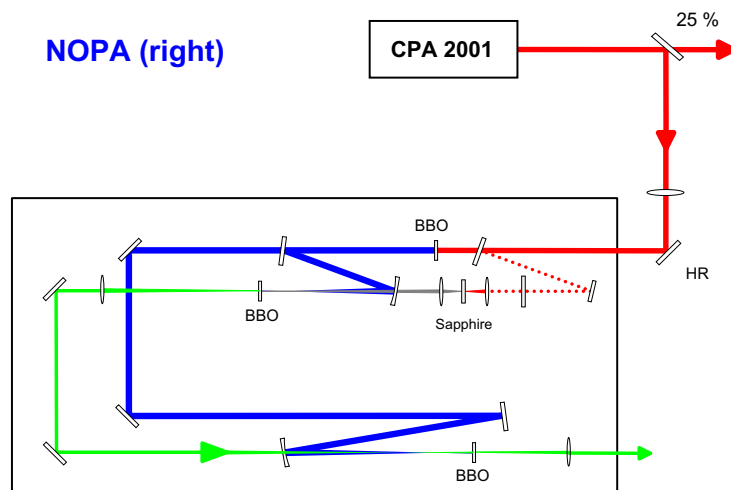


Abbildung 2.5: Aufbau des NOPA (nach Wilhelm et al. [16])

Für die Erzeugung der NIR Schaltimpulse bei ca. 1100 nm wurde (zusammen mit Stefan Laimgruber) ein zweistufiger (kollinearer) optisch-parametrischer Verstärker (OPA) aufgebaut (Abb. 2.6). Das Design des OPA wurde an das in [49, 50] beschriebene Design angelehnt. Jede der beiden Verstärkerstufen besteht aus einem Typ-II BBO Kristall und wird von den Impulsen der Laserfundamentalen aus dem CPA gespeist. Zum Starten des Verstärkungsprozesses der ersten Stufe (Pump-Impulsenergie ca. 30 μJ) wird ein in einer Saphirscheibe erzeugtes Weißlichtkon-

tinuum verwendet. Das Signal der ersten Stufe wird dann in der zweiten Stufe (Pump-Impulsenergie ca. $200 \mu\text{J}$) auf eine Impulsenergie von über $20 \mu\text{J}$ verstärkt. Die Signalimpulse (ca. 1100 nm) werden anschließend durch einen Polarisator von den Idlerimpulsen (ca. $2.6 \mu\text{m}$) getrennt und in einem SF10-Prismenkompressor auf ca. 40 fs komprimiert.

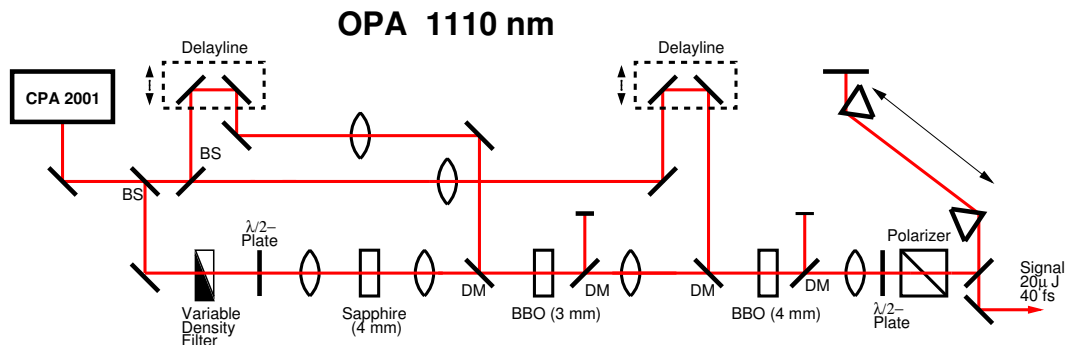


Abbildung 2.6: Aufbau des OPA (BS=Strahlteiler, DM=Dichroitischer Spiegel)

Für den effizienten Betrieb eines optischen Schalters mit einer Zeitaufösung im Femtosekundenbereich muß das Fluoreszenzlicht der Probe unter einem möglichst großen Raumwinkel eingesammelt werden. Ebenso muß darauf geachtet werden, die Dispersion auf dem Weg zwischen Probe und Kerr-Medium möglichst gering zu halten. Aus diesen Gründen wurde für den Aufbau des Kerr-Schalters so weit wie möglich reflektive Optik verwendet (Abb. 2.7). Zwei Mikroskopobjektive (Typ Cassegranian, Fa. Ealing, Numerische Apertur 0.5, Fokallänge 13 mm) sammeln das Fluoreszenzlicht ein und bilden es auf das Kerr-Medium ab. Als Kerr-Medium dienen Quarzglasplatten (SUPRASIL 300, Fa. Helma) mit einer Schichtdicke zwischen 0.3 mm und 1.2 mm . Das Fluoreszenzlicht wird von einem Drahtgitterpolarisator (ProFluxTM PPL04C, Substratdicke 0.7 mm , Auslöschung $1:1000$ für $\lambda > 350 \text{ nm}$) polarisiert, welcher sich zwischen dem zweiten Mikroskopobjektiv und dem Kerr-Medium befindet. Ein zweiter Drahtgitterpolarisator hinter dem Kerr-Medium dient (in Abwesenheit von Schaltimpulsen) zur Auslöschung des Fluoreszenzlichts. Die Schaltimpulse werden über einen kleinen Spiegel in der Abschattung des zweiten Mikroskopobjektivs auf das Kerr-Medium abgebildet. Die Polarisationsrichtung der Schaltimpulse ist relativ zur Polarisationsrichtung des Fluoreszenzlichts um 45° gedreht. Das Fluoreszenzlicht und die Schaltimpulse laufen kollinear durch das Kerr-Medium. Dadurch wird eine Verschlechterung der Zeitaufösung, welche die Folge einer nicht-kollinearen Anordnung wäre, verhindert. Das geschaltete Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe von aluminiumbeschichteten Off-Axis Parabolspiegeln eingesammelt und auf den Spalt des Spektrographen abgebildet. Im Gegensatz zu den ursprünglich verwendeten silberbeschichteten Spiegeln und der achromatischen Linse [48] ist hier die Reflektivität im ultravioletten Spektralbereich deutlich größer und somit zwischen 350 nm

und 400 nm ein höheres Signal zu erreichen. Die Durchmesser und Brennweiten der Off-Axis Parabolspiegel wurden so gewählt, daß das gesamte geschaltete Fluoreszenzlicht auf das Gitter des Spektrographen abgebildet wird. Ein senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Fluoreszenz stehender dielektrischer Spiegel (HR 1060 nm, 45°) und für das jeweilige Experiment geeignet gewählte Langpaßfilter dienen zum Herausfiltern des gestreuten Schalt- und Anregungslichts. Der Spektrograph (Acton Research, Spektra Pro 300i, $f = 300$ mm, Apertur 0.25) ist mit zwei Gittern mit 150 Strichen/mm ausgestattet, deren Wellenlängen maximaler Reflektion bei 500 nm bzw. 800 nm liegen. Das spektral aufgelöste Fluoreszenzlicht wird von einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten CCD-Kamera (Princeton Instruments, Spec-10:400B) detektiert. Der durch diese Anordnung abgedeckte Spektralbereich erstreckt sich von ca. 350 - 1000 nm.

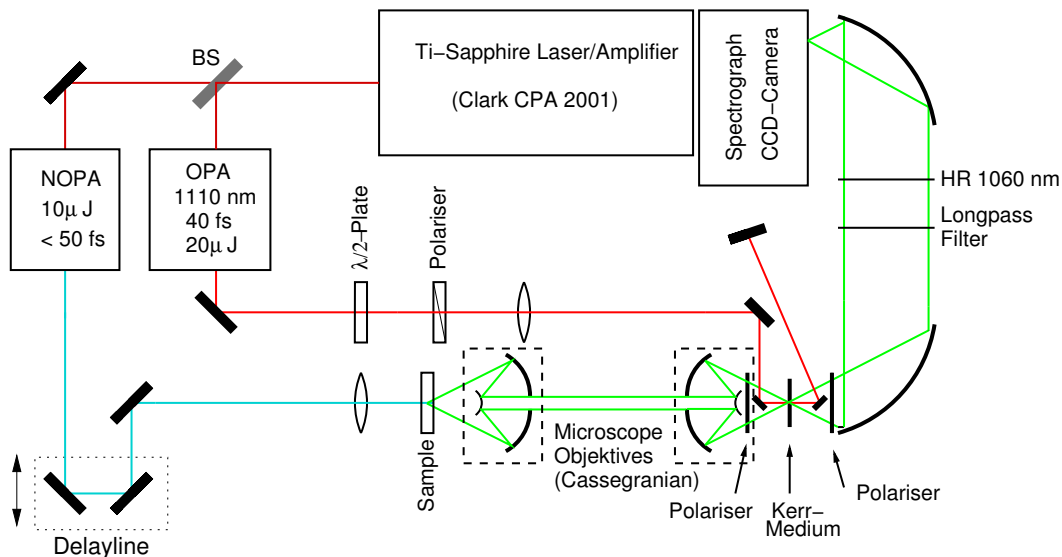


Abbildung 2.7: Aufbau des Kerr-Schalter Systems

2.5 Wahl des Kerr-Mediums

Die Wahl eines geeigneten Kerr-Mediums ist an verschiedene Rahmenbedingungen geknüpft. Die im Kerr-Medium induzierte Anisotropie sollte dem elektrischen Feld der Schaltimpulse nahezu instantan folgen. Die Gruppengeschwindigkeitsdispersion muß möglichst gering sein. Der durch das Auftreffen der Schaltimpulse erzeugte Untergrund darf nicht sehr hoch sein. Dagegen muß die Schalteffizienz groß genug sein. Schließlich sollte das Kerr-Medium vom ultravioletten bis in den nahinfraroten Spektralbereich transparent sein. Während die ersten beiden Punkte Voraussetzung für eine gute Zeitauflösung sind, sind die nächsten beiden Punkte wichtig für ein

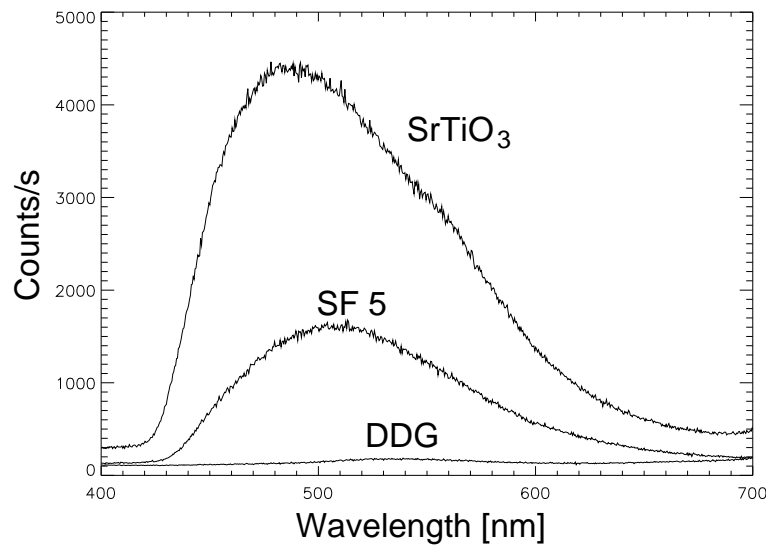


Abbildung 2.8: Durch die Schaltimpulse ($\lambda = 775 \text{ nm}$) induziertes Untergrundsignal verschiedener Kerr-Gläser (DDG = Diadeckglas). Das sehr viel schwächer ausgeprägte Untergrundsignal in Quarzglas ist hier nicht eingezeichnet.

gutes Signal- zu Rauschverhältnis.

Daher kommen für eine Zeitauflösung im Bereich von 100 fs als Kerr-Medium nur Festkörper (in der Regel Gläser) in Frage. In Flüssigkeiten und Gasen findet die Ausrichtung und Relaxation der Moleküle nach Einstrahlung der Schaltimpulse im Zeitbereich von Pikosekunden statt (zum Vergleich zwischen CS_2 und Bi_2O_3 -Glas siehe z.B. [22]). In Festkörpern trägt zur induzierten Anisotropie im Wesentlichen nur die Auslenkung der Elektronen bei, welche dem elektrischen Feld der Schaltimpulse nahezu instantan folgen (siehe z.B. [51]). Ein möglicher Beitrag der Kerne zur Anisotropie ist in Festkörpern nur sehr schwach ausgeprägt [51] und wird hier nicht beobachtet.

Gläser mit großem nichtlinearem Brechungsindex n_2 scheinen auf den ersten Blick die geeignete Wahl als Kerr-Medium zu sein. Jedoch besitzen solche Gläser stets auch eine große Dispersion im sichtbaren Spektralbereich (siehe z.B. [51]), was zu einer Verschlechterung der Zeitauflösung führt. Aus diesem Grund wurde, trotz des relativ kleinen nichtlinearen Brechungsindex n_2 , Quarzglas als Kerr-Medium gewählt. Unter den getesteten Gläsern (SrTiO_3 , BK 7 Glas, SF 5 Glas) wird mit Quarzglas die beste Zeitauflösung erreicht.

Die Schalteffizienz für das an einer Streuscheibe gestreute Licht der Anregungsimpulse liegt dennoch in Abhängigkeit der Schichtdicke des Kerr-Mediums bei ca. 2-10%. Da für das Fluoreszenzlicht von Proben das Anregungsvolumen größer, die Abbildung auf das Kerr-Medium also schlechter ist als für das an einer Streuscheibe gestreute Anregungslicht, ist die Schalteffizienz etwas geringer, beträgt aber trotzdem noch ca. 1-4%.

Ein weiterer Vorteil von Quarzglas ist die weit im ultravioletten Spektralbereich liegende Bandlücke. Da die Intensitäten der Schaltimpulse zum Erreichen hoher Schalteffizienzen groß sein müssen, wird durch Mehrphotonenabsorption im Kerr-Medium ein breiter unstrukturierter Emissionsuntergrund über den gesamten sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich gebildet. Dieser Untergrund ist in den anderen Gläsern (SrTiO_3 , BK 7 Glas, SF 5 Glas) bei Verwendung von Schaltimpulsen mit einer Wellenlänge von ca. 800 nm so groß, daß zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an Molekülen mit kleiner Oszillatorstärke kaum möglich sind (Abb. 2.8). Bei Quarzglas ist ein solcher Untergrund sehr viel schwächer ausgeprägt.

2.6 Charakterisierung des Kerr-Schalters

Bei Verwendung der Fundamentalen der Laserimpulse als Schaltimpulse wird der spektroskopisch interessante Spektralbereich um 800 nm von der Beobachtung ausgeschlossen (grau markierter Bereich in Abb. 2.9). Durch den Einsatz von Schaltimpulsen im nahinfraroten Spektralbereich um 1100 nm wird der Spektralbereich um 800 nm nun für Fluoreszenzmessungen zugänglich. Zusätzlich ist der breite, im Kerr-Medium gebildete Emissionsuntergrund nun nahezu vollständig verschwunden (Abb. 2.9). Es ist nur noch eine schmale Emission um ca. 550 nm zu sehen, welche wahrscheinlich von einem Frequenzverdopplungsprozeß an der Oberfläche des Kerr-Mediums stammt. Die Höhe dieser Emission ist abhängig von der Qualität des Quarzglases. Für SUPRASIL 300 Glas wurde die geringste Emissionsintensität beobachtet. In Abb. 2.9 ist zum Vergleich ein zeitaufgelöstes Fluoreszenzspektrum von β -Carotin am Zeitnullpunkt eingezeichnet (Probenpräparation und Anregungsbedingungen werden weiter unten beschrieben).

Die ideale Lichtquelle zur Charakterisierung des Kerr-Schalter-Experiments sollte eine große spektrale Breite besitzen, welche sich über den gesamten Detektionsbereich erstreckt, und sollte dem Zeitverlauf der Impulse, durch welche sie erzeugt wird, instantan folgen. Ein durch ultrakurze Laserimpulse in einem transparenten Medium erzeugtes Weißlichtkontinuum kommt diesem Ideal am nächsten. Die Impulsdauer eines solchen Kontinuums in einem bestimmten Spektralbereich kann sogar kürzer sein als die Dauer der erzeugenden Impulse. Ein Weißlichtkontinuum ist daher für die Bestimmung der Zeitauflösung und der Dispersion sehr gut geeignet. Im konkreten Fall wurde ein Weißlichtkontinuum durch Fokussieren von NOPA Impulsen (475 nm) auf eine 2 mm dicke, rotierende CaF_2 -Scheibe erzeugt und zeitaufgelöst gemessen (Abb. 2.10). Im Höhenlinienbild ist die Intensität des geschalteten Lichts gegen Wellenlänge und Verzögerungszeit aufgetragen. Die Ursache der gekrümmten Form der Emission ist die Gruppengeschwindigkeitsdispersion des Kerr-Schalters.

Zur näheren Untersuchung dieser Dispersion wurde die Wellenlängenabhängigkeit der Emissionsmaxima entlang der Zeitachse bestimmt. Die auf diese Weise ermittelte Dispersion zwischen 500 nm und 800 nm beträgt nur 0.2 ps. Zur Dispersion im Kerr-Schalter tragen drei Komponenten bei: die CaF_2 -Scheibe, der Drahtgitterpolarisator

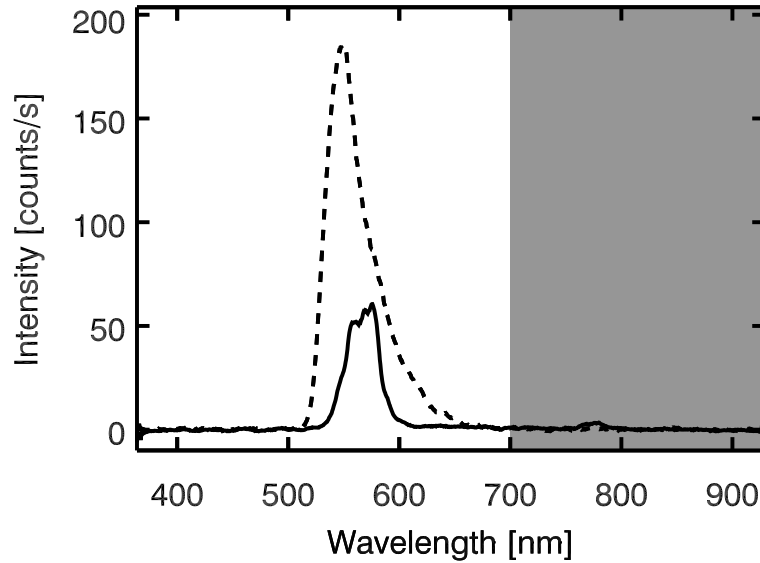


Abbildung 2.9: Emissionsuntergrund von Quarzglas (durchgezogene Linie) bei Verwendung von Schaltimpulsen bei ca. 1100 nm. Zum Vergleich ist ein zeitaufgelöstes Fluoreszenzspektrum von β -Carotin (unterbrochene Linie) am Zeitnullpunkt eingezeichnet, bei welchem der Untergrund bereits subtrahiert wurde. Die grau markierte Fläche stellt den bei Verwendung von Schaltimpulsen um ca. 800 nm von der Beobachtung ausgeschlossenen Bereich dar.

(Substrat 0.7 mm Corning 1737F Glas) und das Kerr-Medium (1 mm Quarzglas). Unter der Annahme, daß das Weißlichtkontinuum in der Mitte der CaF_2 -Scheibe erzeugt wird, wurde für die Dispersion ein theoretischer Wert von 209 fs berechnet. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem gemessenen Wert überein. Die in den Experimenten gemessenen Daten werden jeweils um den hier bestimmten Beitrag der Dispersion zeitnullpunktskorrigiert. Es wird dabei zusätzlich noch der Beitrag des jeweiligen Lösungsmittels berücksichtigt. Die Lösungsmitteldispersionsdaten sind der Literatur entnommen (z.B. [52]). Zur Überprüfung der Dispersionskorrektur wird vor einem Experiment in einer Küvette mit reinem Lösungsmittel ein Weißlichtkontinuum erzeugt (welches jedoch nicht so spektral breit ist wie das in CaF_2 erzeugte). Die so gefundenen Daten stimmen ebenfalls mit den zuvor ermittelten Daten für das breitbandige CaF_2 -Weißlichtkontinuum überein.

Mit Hilfe der Weißlichtdaten kann nicht nur die Dispersion bestimmt, sondern durch Bestimmung der Halbwertsbreite entlang der Zeitachse experimentell auch eine untere Grenze der Zeitauflösung angegeben werden (~ 80 fs für ein Kerr-Medium der Schichtdicke $d_{KM} = 1.0$ mm). Simulationen zur Zeitauflösung ergeben für Impulsdauern der Anregungs- und Schaltimpulse von ~ 40 fs abhängig von der Wellenlänge und der Schichtdicke des Kerr-Mediums Werte zwischen 60 fs ($\lambda_{Anr} = 550$ nm, $d_{KM} = 0.3$ mm) und 120 fs ($\lambda_{Anr} = 480$ nm, $d_{KM} = 1.2$ mm). Tatsächlich konnte durch Optimierung der Kompressoranordnung in der Impulserzeugung und durch

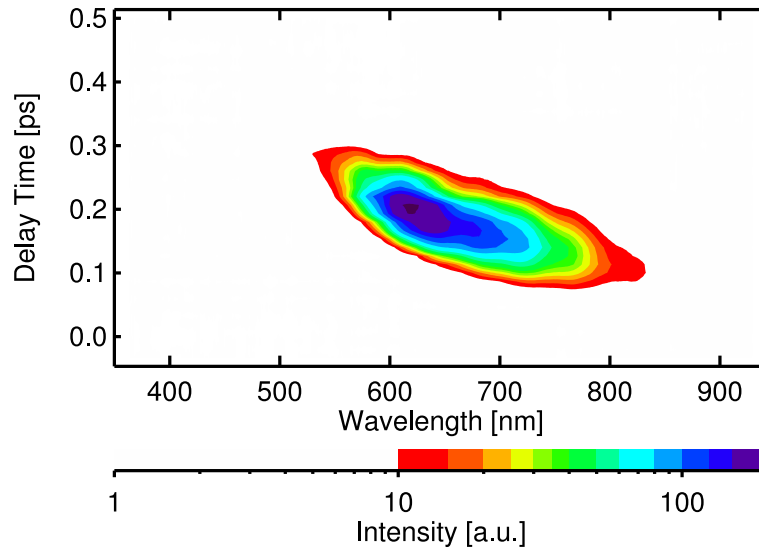


Abbildung 2.10: Zeitaufgelöste Messung eines Weißlichtkontinuums, erzeugt in einer CaF_2 -Scheibe. Die Intensität des geschalteten Lichts ist aufgetragen gegen Wellenlänge und Verzögerungszeit.

Verwendung eines dünneren Kerr-Mediums ($d_{KM} = 0.3$ mm anstatt $d_{KM} = 1.0$ mm) die Zeitauflösung von ca. 130 fs [48] auf ca. 90 fs verbessert werden (siehe auch Messung an β -Carotin in Toluol).

Außer der Zeitnullpunktskorrektur muß bei der Auswertung der aufgenommenen Spektren auch die spektrale Empfindlichkeit des Aufbaus berücksichtigt werden. Zwei Faktoren tragen zu dieser Empfindlichkeit bei: die 'statische' Empfindlichkeit und die Wellenlängenabhängigkeit der Schalteffizienz $g(\lambda)$. Unter der 'statischen' Empfindlichkeit versteht man die Transmissions- und Reflektionseigenschaften der optischen Komponenten und die Quantenausbeute der CCD-Kamera. Mit Hilfe eines Schwarzen Strahlers als Referenz kann diese Empfindlichkeit leicht bestimmt und in den Spektren korrigiert werden. Für die Schalteffizienz $T(\lambda)$ wird, wie bereits zuvor beschrieben, eine Abnahme mit zunehmender Wellenlänge erwartet, da für eine vorgegebene Kerr-Anisotropie die Phasenverschiebung im Kerr-Medium mit zunehmender Wellenlänge abnimmt. Diese Beziehung wird experimentell überprüft, indem das stationäre Spektrum $S_{cw}(\lambda)$ mit den entlang der Zeitachse integrierten zeitaufgelösten Spektren $S(\lambda, t)$ verglichen wird:

$$T(\lambda) = \frac{1}{\tau_{cc}} \frac{\int_0^\infty S(\lambda, t) dt}{S_{cw}(\lambda)}$$

Als Öffnungszeit des Kerr-Schalters τ_{cc} wird die experimentell bestimmte Zeitauflösung (FWHM) eingesetzt. Prinzipiell ist τ_{cc} zwar eine von der Wellenlänge abhängige Größe, jedoch hat sich im Experiment gezeigt, daß die Öffnungszeit des Kerr-Schalters über den gesamten Spektralbereich der Fluoreszenz der gemessenen Pro-

ben in etwa konstant bleibt. Unter der Annahme, daß der nichtlineare Brechungsindex, welcher für den Kerr-Effekt verantwortlich ist, vernachlässigt werden kann, sollte die Schalteffizienz $T(\lambda)$ proportional zu $\frac{1}{\lambda^2}$ [25, 47] sein, d.h. Multiplikation der entlang der Zeitachse integrierten Spektren sollte das stationäre Spektrum $S_{cw}(\lambda)$ wiedergeben. Daß dies in der Tat der Fall ist, zeigt Abb. 2.11. Aus diesem Grund werden für die spektrale Korrektur alle Spektren mit λ^2 multipliziert.

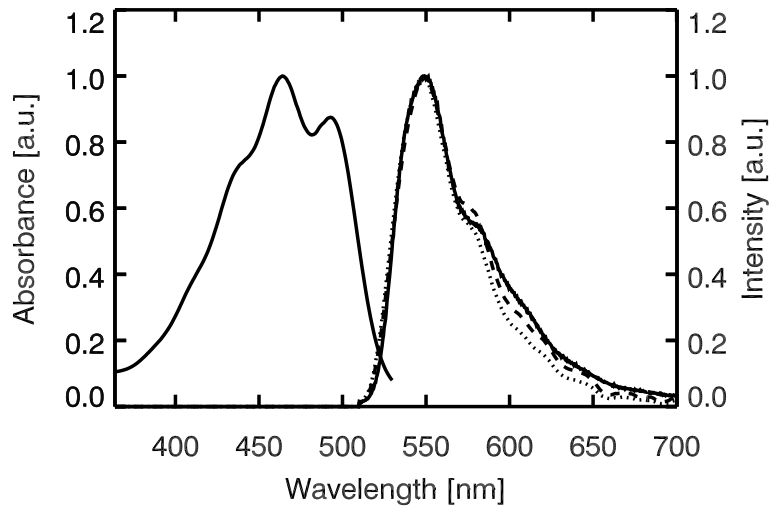


Abbildung 2.11: Stationäre Spektren von β -Carotin in Toluol. Die Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe des Kerr-Schalters aufgenommen und sind auf die spektrale Empfindlichkeit des Aufbaus korrigiert. Das nicht zeitaufgelöste Spektrum (durchgezogene Linie) wurde bei offener Polarisatorstellung aufgenommen. Die zeitaufgelösten Spektren wurden entlang der Zeitachse integriert und sind mit (gestrichene Linie) und ohne (gepunktete Linie) λ^2 -Korrektur (siehe Text) eingezeichnet.

2.7 β -Carotin in Toluol

Die Leistungsfähigkeit des Kerr-Schalters unter echten experimentellen Bedingungen soll nun an einem Farbstoff demonstriert werden. Eine geeignete Wahl ist β -Carotin, da es ein sehr großes optisches Übergangsdipolmoment besitzt (der Extinktionskoeffizient in Cyclohexan ist $\epsilon = 134300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, [53]) und daher ein großes transientes Fluoreszenzsignal zu erwarten ist. Da β -Carotin bereits ausgiebig untersucht worden ist (z.B. [53–55]), ist eine Überprüfung der Meßergebnisse möglich.

Für die Absorptionmessungen wurden $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und für die Emissionsmessungen $7.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Lösungen von β -Carotin in Toluol jeweils frisch hergestellt. Es wurden jeweils Quarzglas-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Bei den Emissionsmessungen wurde die Probe umgepumpt, so daß mit jedem Laserimpuls ein frisches Probenvolumen angeregt wurde. Die Anregung mit NOPA Impulsen

erfolgte bei einer Zentralwellenlänge von 490 nm (Pulsenergie 130 nJ) nahe dem Absorptionsmaximum von β -Carotin (Abb. 2.11). Die zeitaufgelösten Spektren (Abb. 2.12) wurden bei einer Schaltimpulsenergie von ca. 20 μ J und einer Belichtungszeit von 6 s pro Schritt der Verzögerungsstrecke aufgenommen. Die gesamte Meßzeit für die hier gezeigten Daten betrug weniger als zehn Minuten. Das Maximum der zeitaufgelösten Spektren liegt bei ca. 540 nm. Abgesehen von einer geringfügigen Verbreiterung und einer leichten Verschiebung der Spektren bleibt deren Form über den gesamten Zeitverlauf im wesentlichen erhalten. Dies ist in hervorragender Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Macpherson und Gillbro [53], die das Fluoreszenzmaximum bei 542 nm sehen und ebenfalls keine Änderung der Spektren mit der Zeit finden.

Der Zeitverlauf der Fluoreszenz am Emissionsmaximum wurde mit Hilfe einer Modellfunktion angepaßt. Die Modellfunktion besteht aus zwei exponentiellen Zerfällen, die zur Simulation der endlichen Zeitauflösung mit einer Gaußfunktion gefaltet sind. Die besten Werte der Anpassung sind 90 fs für die Zeitauflösung (FWHM) und 115 fs für den dominanten Zerfall. Für den zweiten exponentiellen Zerfall wird bei einer Amplitude von nur 3% eine Zeitkonstante von \sim 400 fs bestimmt. Der hier gefundene Wert von 115 fs ist sehr nahe an dem mit Hilfe von Up-Conversion Messungen bestimmten Wert von 144 fs [53]. Die leichte Abweichung kann zumindest teilweise durch die Verwendung einer bi-exponentiellen Anpassungsfunktion hier und einer mono-exponentiellen Anpassungsfunktion in [53] erklärt werden.

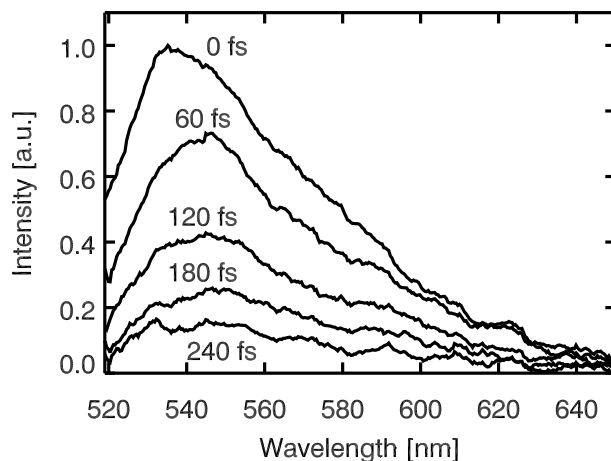


Abbildung 2.12: Zeitaufgelöste Spektren von β -Carotin in Toluol. Die Spektren sind zeitnullpunkts- und spektral korrigiert.

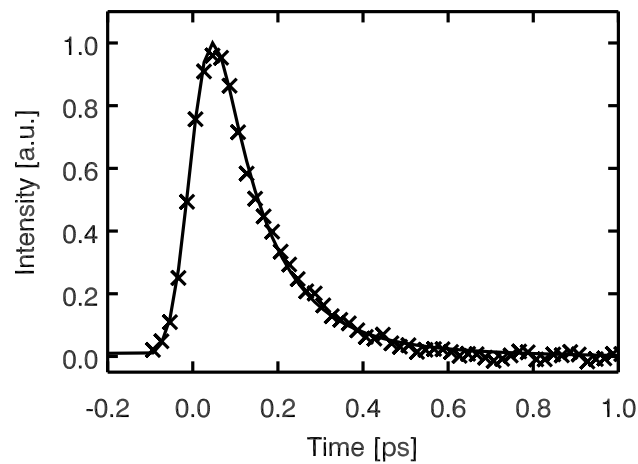


Abbildung 2.13: Zeitverlauf der Fluoreszenz von β -Carotin in Toluol am Emissionsmaximum

2.8 Zusammenfassung

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Kerr-Schalter System ist (meines Wissens) das erste, welches bei einer Zeitauflösung von ca. 100 fs die Messung von Fluoreszenzspektren vom ultravioletten bis in den nahinfraroten Spektralbereich (350 nm - 1000 nm) ermöglicht. Bei einer Schalteffizienz von mehreren Prozent des einfallenden Fluoreszenzlichts und einem äußerst niedrigen Untergrund wird ein sehr gutes Signal- zu Rauschverhältnis erzielt, welches auch Experimente an Proben mit kleiner strahlender Rate erlaubt. Wegen der simultanen Schaltung kompletter Spektren ist diese Technik selbst breitbandiger Up-Conversion [44] überlegen. Da im Gegensatz zur Up-Conversion die Notwendigkeit der Rücktransformation der Spektren in den sichtbaren Spektralbereich entfällt, sind auch Messungen bis weit in den ultravioletten Spektralbereich möglich. Die Leistungsfähigkeit des Kerr-Schalter Systems wird auch durch die in den nächsten Kapiteln vorgestellten Studien demonstriert.

3 Isomerisierung von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol

3.1 Photochemie von Azobenzol

Azobenzole werden seit dem Aufkommen der chemischen Industrie im 19. Jahrhundert als Farbstoffe verwendet [56]. Bis heute finden sie eine breite Anwendung in Wissenschaft und Technik. Eine recht bekannte technische Anwendung ist beispielsweise die Beschichtung von beschreibbaren CD's und DVD's. Da Azobenzolfarbstoffe einen hohen Brechungsindex (~ 2) und eine hohe Lebensdauer besitzen und gebunden an ein Metallion sehr temperaturstabil sind (bis ca. 300°C) [57], kann eine lange Lebensdauer des Datenträgers und eine hohe Datensicherheit gewährleistet werden.

Die thermisch stabile Form von Azobenzol ist das trans-Isomer, bei dem die beiden Phenylringe auf entgegengesetzten Seiten der Azogruppe ($-\text{N}=\text{N}-$) liegen (Abb. 3.1). Photoanregung von Azobenzol induziert eine Isomerisierung in das metastabile cis-Isomer (die Phenylringe liegen auf der gleichen Seite). Anregung des cis-Isomers führt zur Rückbildung der trans-Form. Da es sich bei solchen Isomerisierungen um einen zentralen Prozeß der organischen Chemie handelt, wurde die Isomerisierung intensiver untersucht (siehe unten).

Eine weitere Motivation für diese Studien sind (wissenschaftliche) Anwendungen, die auf der beträchtlichen Geometrieänderung im Zuge der Isomerisierung beruhen. Eine solch große Änderung der Geometrie des Moleküls kann beispielsweise dazu verwendet werden, die Faltung (trans \rightarrow cis) bzw. Entfaltung (cis \rightarrow trans) eines Peptidrings anzuregen und zu untersuchen [58–60]. Auf diese Weise konnten wertvolle Erkenntnisse zur Proteinfaltung gewonnen werden.

Azobenzol wurde mit verschiedenen experimentellen Methoden, wie transienten Absorptionsmessungen [61–64], zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen [33, 65] und

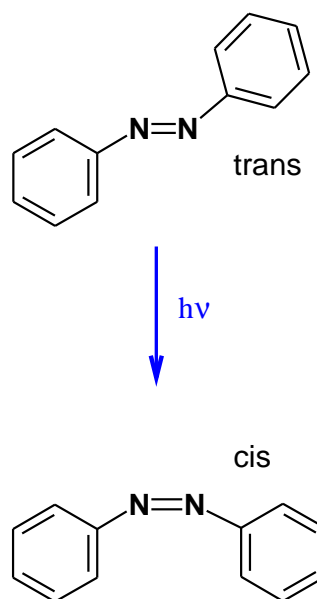


Abbildung 3.1: trans \rightarrow cis Isomerisierung des Azobenzols. Im trans-Zustand hat Azobenzol eine Länge von $\sim 9 \text{ \AA}$, welche sich im cis-Zustand auf lediglich $\sim 5 \text{ \AA}$ reduziert.

zeitaufgelöster Photoelektronenspektroskopie [66] ausführlich untersucht. Zeitaufgelöste transiente Absorptionsmessungen [62, 63] haben für die trans→cis-Reaktion ein biphasisches Verhalten mit Zeitkonstanten von 0.32 ps und 2.1 ps in Ethanol bzw. 0.34 ps und 3.0 ps in DMSO gefunden. Die cis→trans-Reaktion ist mit 0.17 ps in Ethanol bzw. 0.1 ps in DMSO deutlich schneller und nur einfach exponentiell.

Auf der Grundlage dieser Experimente durchgeführte quantenchemische Berechnungen (z.B. [67–69]) haben verschiedene Reaktions- und Potentialschemata ergeben. In den hier beispielsweise dargestellten Simulationen nach Ciminelli et al. [68] (Abb. 3.2) wurden die Potentialflächen des Grundzustands und mehrerer elektronisch angeregter Zustände berechnet. Für die Torsion um die N=N Bindung wird eine barrierefreie Bewegung entlang der Reaktionskoordinate auf der elektronisch angeregten Potentialfläche vorhergesagt, während für die Inversion eine kleine Barriere überwunden werden muß. Daraus wird geschlossen, daß als Mechanismus der Isomerisierung die Torsion bevorzugt wird. Die Interpretation der Ergebnisse der Experimente und Rechnungen ist jedoch nach wie vor ein Gegenstand der Diskussion. Es ist bisher nicht gelungen, eindeutig die Potentialverläufe der beteiligten Zustände oder gar den Reaktionsmechanismus zu bestimmen. Selbst die Anzahl der beteiligten Zustände ist noch nicht klar festgelegt (z.B. [64] vs. [66]).

3.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol

In der hier vorliegenden Arbeit wird ein Push-Pull substituiertes Azobenzolmolekül untersucht (4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol, NA). Es sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu unsubstituiertem Azobenzol herausgearbeitet werden. Dies soll zu einem besseren Verständnis des Potentialbildes von Azobenzol beitragen und die Grundlage für einen Vergleich mit quantenchemischen Berechnungen bilden.

Das Hinzufügen dieser speziellen Substituenten zu Azobenzol führt zu einer Änderung der elektronischen Struktur des Moleküls (siehe Vergleich der statischen Spektren von trans-NA und trans-Azobenzol in Abb. 3.3). Resonanz-Raman Experimente [70, 71] zeigen, daß bei NA in Lösungsmitteln, welche zumindest leicht polar sind (z.B. Benzol), die Photoanregung zu einem Übergang in einen ladungstrennten (CT-) Zustand führt (Abb. 3.4) und NA anschließend, ebenso wie Azobenzol, vom trans- in den cis-Zustand isomerisiert. Aus einer Analyse der Absorptionsspektren [70, 71] geht hervor, daß die CT-Absorptionsbande in diesen Lösungsmitteln nahezu mit der $n\pi^*$ -Bande und der $\pi\pi^*$ -Bande zusammenfällt, diese jedoch dominiert. Es kann auf Grund dieser Analyse weiterhin als sehr wahrscheinlich angenommen werden, daß die CT-Absorption den Übergang in den niedrigsten elektronisch angeregten Zustand darstellt. Die deutliche Änderung der elektronischen Struktur zeigt sich auch daran, daß die thermische Rückreaktion vom cis- zum trans-Zustand, im Gegensatz zum Azobenzol, sehr schnell ist. Sie verläuft abhängig vom Lösungsmittel in einigen 10 Sekunden bis weit unter 1 Sekunde [72].

3.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol

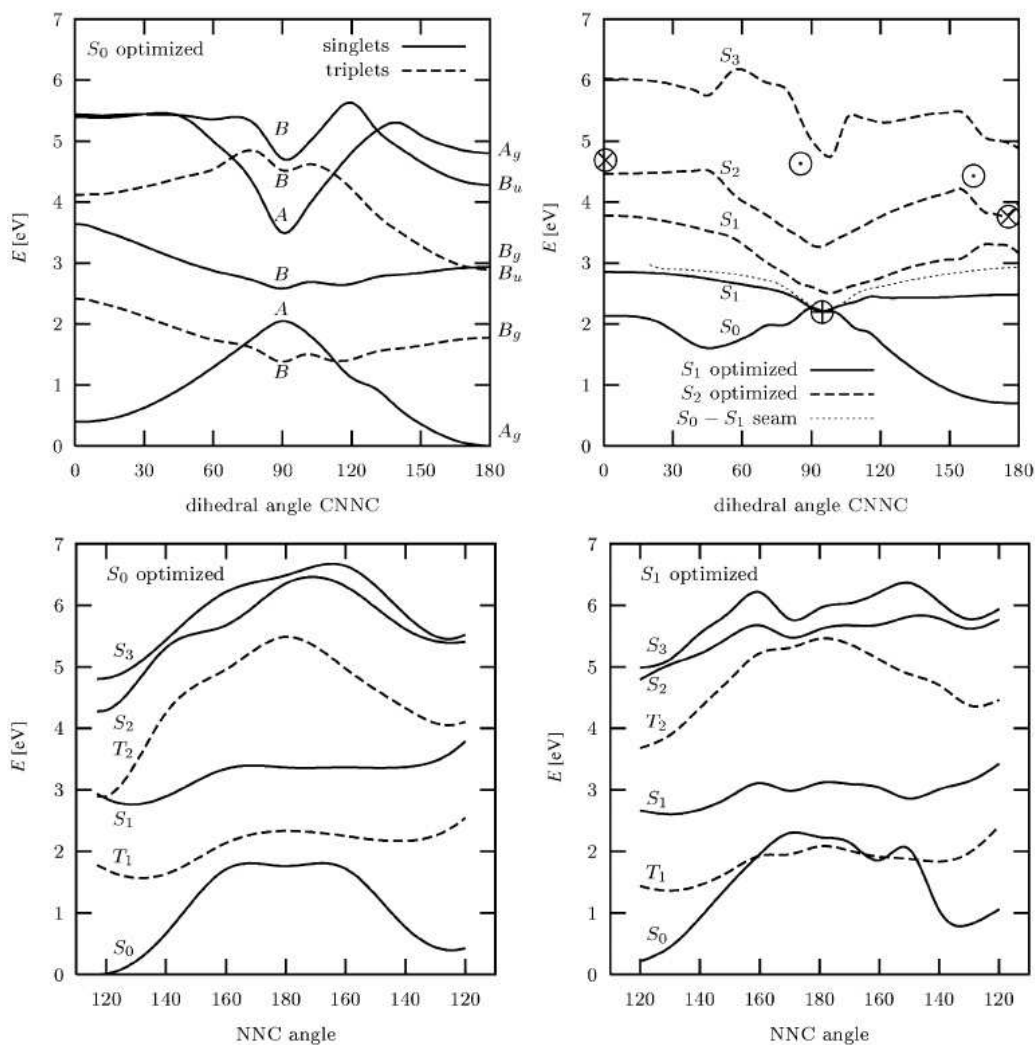


Abbildung 3.2: Azobenzol-Potentialschema für Torsion (oben) und Inversion (unten) (nach Ciminelli et al. [68])

Zur Gewinnung eines möglichst vollständigen Bildes der Photodynamik von NA wurde das Verhalten nach Photoanregung sowohl in Emission als auch in transienter Absorption gemessen. Bei transienten Absorptionsmessungen an NA tragen das Ausbleichen des Grundzustands und Absorption aus dem elektronisch angeregten Zustand zum Signal bei. Die stimulierte Emission ist sehr gering und wird von der Absorption des angeregten Zustands vollständig überlagert. Deshalb ist eine Unterscheidung zwischen den Vorgängen im elektronisch angeregten Zustand und im Grundzustand nicht eindeutig möglich. Da bei Fluoreszenzmessungen nur die Emission aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand ein Signal liefert und nicht von Absorptionsbeiträgen verdeckt wird, wird selektiv die Dynamik des angeregten Zustandes beobachtet. Erst die Kombination beider Meßmethoden ermöglicht eine

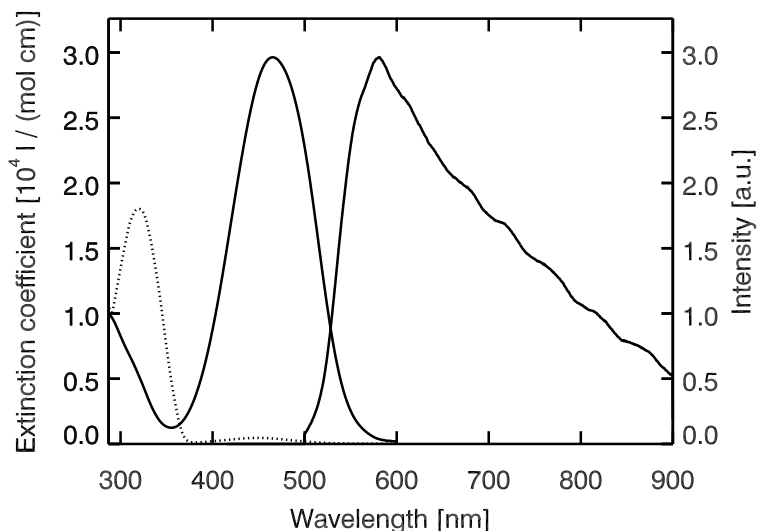


Abbildung 3.3: Statisches Absorptions- und Emissionsspektrum von trans-NA in Toluol. Zum Vergleich ist die Absorption von trans-Azobenzol in Toluol eingezeichnet (gepunktete Linie)

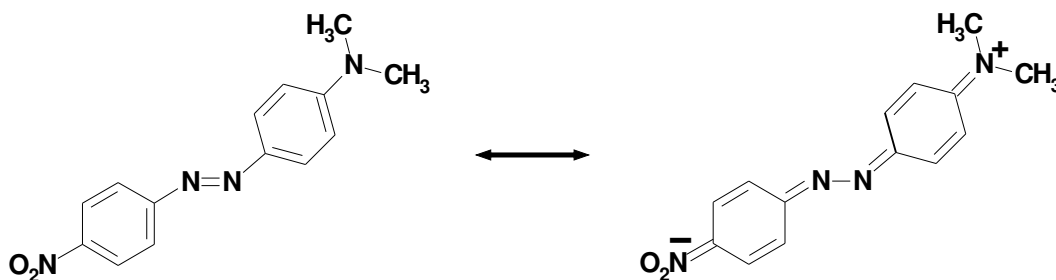


Abbildung 3.4: Ladungstrennung in NA nach Photoanregung

Trennung der Signalbeiträge von angeregtem Zustand und Grundzustand.

Das statische Fluoreszenzspektrum (Abb. 3.3) ist, anders als es vielleicht zu erwarten wäre [28, 29], kein Spiegelbild des Absorptionsspektrums. Vielmehr reicht ein Ausläufer der Fluoreszenz bis weit in den nahinfraroten Spektralbereich.

Ein Überblick der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren ist in Abb. 3.5 (oben) zu sehen. Die Fluoreszenz besitzt ein relativ scharfes Maximum mit kurzer Lebensdauer um ~ 590 nm und einen langen Ausläufer bis in den nahinfraroten Spektralbereich, welcher eine längere Lebensdauer besitzt. Ein Blick auf die Zeitverläufe bei verschiedenen Wellenlängen (Abb. 3.5 unten) zeigt, daß das Fluoreszenzsignal auf der kurzwelligen Seite der Spektren nahezu instantan abfällt, die Zerfallszeit also in etwa der Zeitauflösung entspricht. Hingegen findet man auf der langwelligen Seite einen

3.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol

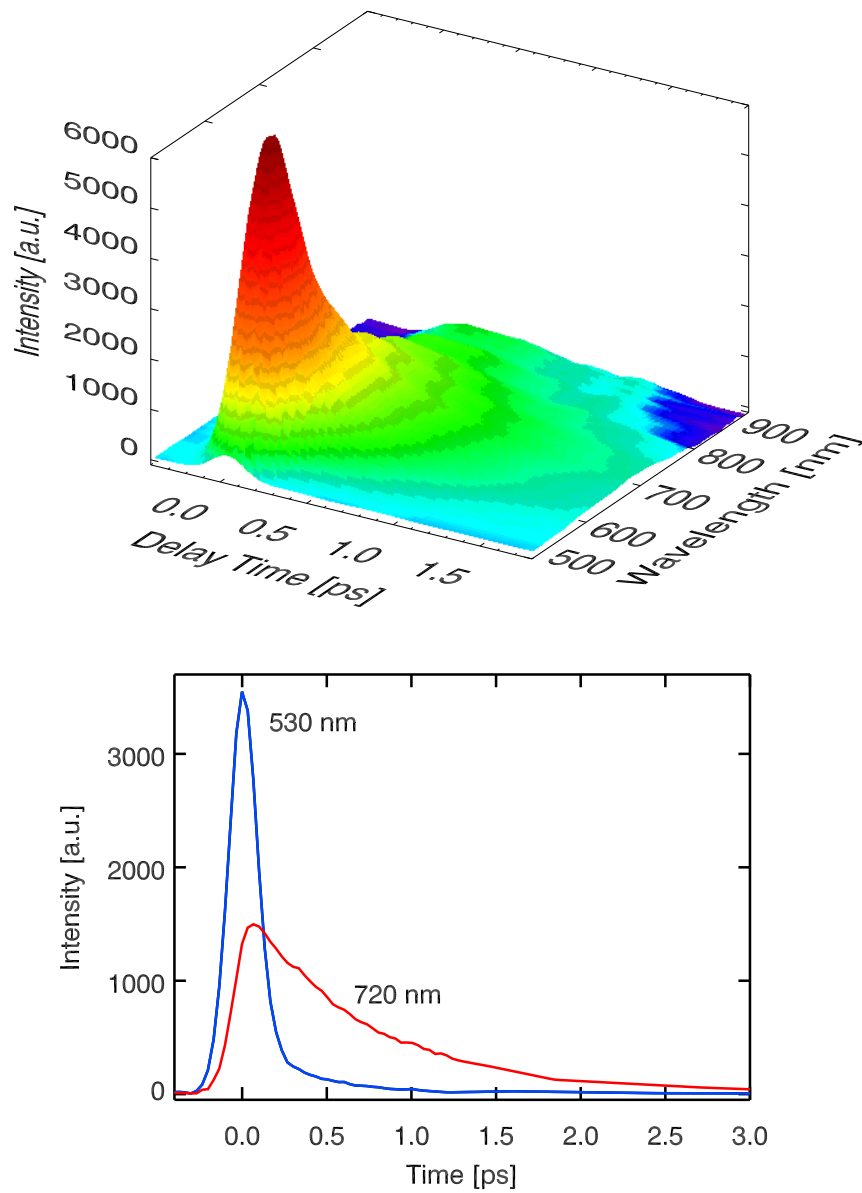


Abbildung 3.5: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von NA in Toluol. Oben: Überblick. Unten: Zeitverläufe der Fluoreszenz bei verschiedenen Wellenlängen.

verzögerten Anstieg und eine deutlich längere Zerfallszeit von ca. 1 ps.

Eine globale Anpassung der Daten mit einer multiexponentiellen Testfunktion liefert einen Überblick über die Dynamik der Fluoreszenz. Eine solche Behandlung der Daten kann nur eine Näherung darstellen, da, wie bereits in der Einleitung erwähnt, bei der Anregung einer Probe in den niedrigsten elektronischen Zustand ein

Ratenmodell mit mehreren Zerfallskonstanten eigentlich nicht gerechtfertigt ist. Da eine Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen aber überraschenderweise sehr gut funktioniert, wird sie hier dennoch benutzt. Für Wellenlängen < 550 nm ist die Anpassung jedoch nur dann erfolgreich, wenn der Zeitnullpunkt als freier Parameter behandelt wird (Inset in Abb. 3.6). Die globale Anpassung der Daten liefert Zeitkonstanten von ~ 80 fs und ~ 800 fs (Abb. 3.6). Die zugehörigen Amplituden stehen etwa im Verhältnis von 10:1 zueinander. Das Amplitudenspektrum der kurzen Zeitkonstante hat seinen höchsten Wert bei ca. 575 nm und stellt den schnellen Zerfall der Fluoreszenz um den Zeitnullpunkt dar. Einhergehend mit diesem Zerfall entsteht verzögert ein breites, rotverschobenes Spektrum mit einer Lebensdauer von ~ 800 fs. Der verzögerte Anstieg des zweiten Spektrums ist an der negativen Amplitude des ersten Spektrums für Wellenlängen > 700 nm zu erkennen.

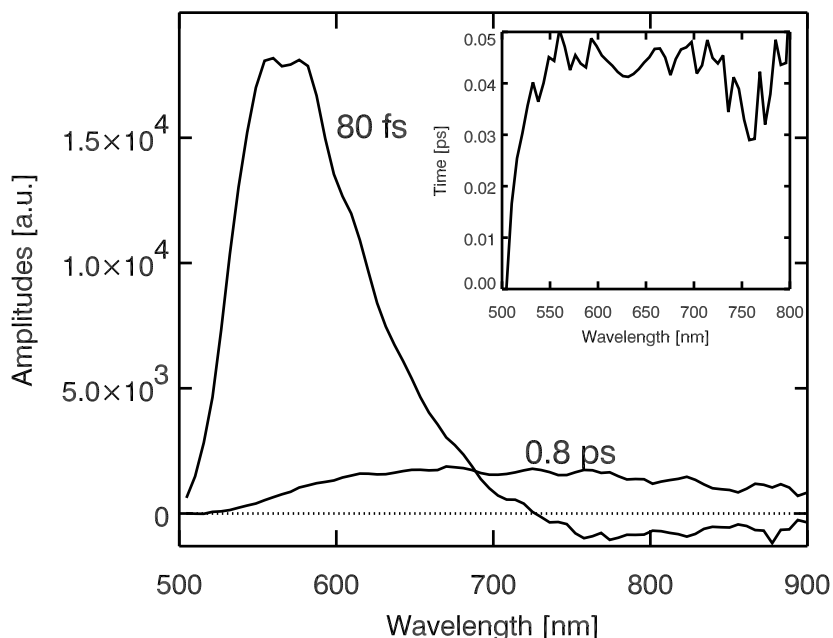


Abbildung 3.6: Amplitudenspektren von NA in Toluol. Die Spektren stammen aus einer globalen Anpassung der Daten in Abb. 3.5 mit einer biexponentiellen Testfunktion. Das Inset zeigt die Wellenlängenabhängigkeit der aus der globalen Anpassung gewonnenen Zeitnullpunkte.

Die Analyse der transienten Absorptionsdaten ergibt Zeitkonstanten von ~ 70 -100 fs, ~ 800 fs und ~ 4 ps (Daten hier nicht gezeigt). Ein kleiner Offset zu großen Verzögerungszeiten belegt den Übergang eines Teils der Moleküle vom trans- in den cis-Zustand. Die schnelle Komponente von ~ 70 -100 fs ist hier ebenfalls mit einem verzögerten Anstieg gleichzusetzen. Die sehr gute Übereinstimmung der ersten beiden Zeitkonstanten mit den Zeitkonstanten der Fluoreszenzdaten zeigt, daß es sich um Vorgänge auf der Potentialfläche des angeregten Zustands handelt. Die ~ 4 ps-

Komponente ist demzufolge einer Dynamik des elektronischen Grundzustands zuzuschreiben.

3.3 Erstellung eines Reaktionsmodells

Durch Kombination der Ergebnisse beider Experimente kann ein Modell der Dynamik von NA nach Photoanregung entwickelt werden (Abb. 3.8). Zunächst fällt dabei der große Stokes-Shift von $\delta\nu_s \approx 4200 \text{ cm}^{-1}$ zwischen dem Maximum der Absorption und dem Maximum des Spektrums der kurzen Zeitkonstante auf. Unter der Voraussetzung, daß es in Abwesenheit von Schwingungs- und Lösungsmittelrelaxationen zu keiner spektralen Verschiebung des Maximums der Fluoreszenz relativ zum Maximum der Absorption käme, müßte man einen solchen Stokes-Shift alleine Relaxationen bzw. Dephasierungen von Schwingungsanregungen und Lösungsmittelrelaxationen zuordnen. Generell hängt ein Stokes-Shift mit der Reorganisationsenergie $\tilde{\lambda}$ bei optischen Übergängen zusammen und sollte, falls die Fluoreszenzlebensdauer größer als die Schwingungs- und Lösungsmittelrelaxationszeiten ist, ca. $2\tilde{\lambda}$ sein (Abb. 3.7).

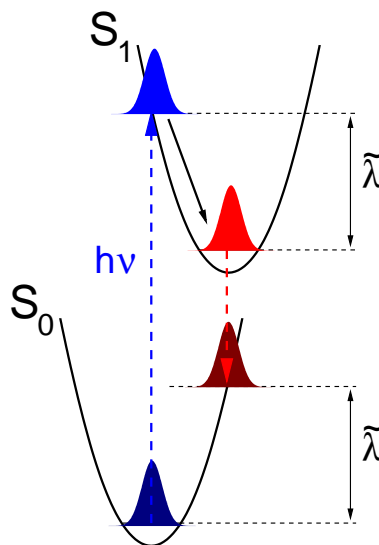


Abbildung 3.7: Reorganisationsenergie $\tilde{\lambda}$ bei optischen Übergängen

Resonanz-Raman Experimente [70] finden für NA eine gesamte Reorganisationsenergie $\tilde{\lambda}$ von 2429 cm^{-1} , welche sich wiederum in einen Schwingungs- und einen Lösungsmittelanteil aufteilt. Ein Stokes-Shift von $\delta\nu_s$, der einer effektiven Reorganisationsenergie von 2100 cm^{-1} entspricht, würde also bedeuten, daß die Relaxation bzw. Dephasierung von Schwingungsanregungen und der größte Teil der Lösungsmittelrelaxation schneller als die Zeitauflösung des Experiments ablaufen. Im Inset in Abb. 3.6, in dem die Wellenlängenabhängigkeit der aus der globalen Anpassung

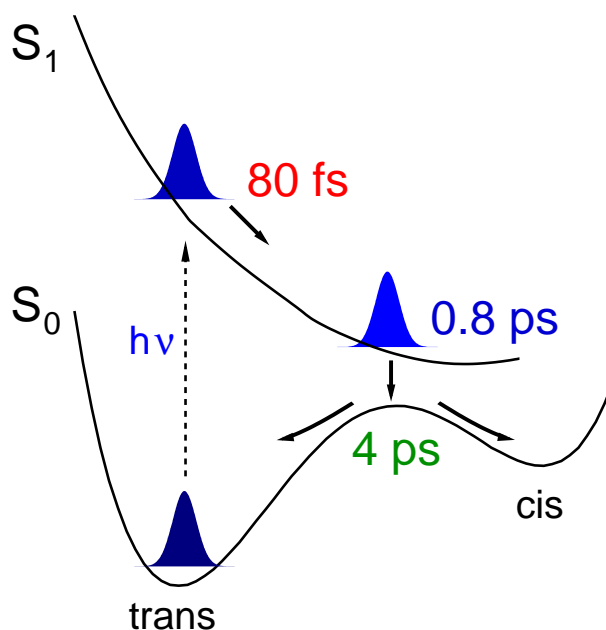


Abbildung 3.8: Reaktionsmodell von NA nach Photoanregung

gewonnenen Zeitnullpunkte dargestellt wird, ist somit nur noch der den langsameren Teilen der Lösungsmittelrelaxation zuzuschreibende Anteil des Stokes-Shifts zu sehen. Eine genauere Analyse ist wegen der dominanten Überlagerung durch die schnelle Zerfallskomponente nicht möglich.

Der Beginn der Isomerisierung kann mit dem Zerfall der schnellen Fluoreszenzkomponente verknüpft werden. Beim CT-Übergang handelt es sich nach [70, 71] sehr wahrscheinlich um eine Anregung in den niedrigsten elektronischen Zustand. Daher kann der schnelle Zerfall nicht mit einem Übergang zwischen elektronisch angeregten Zuständen verbunden werden. Er wird stattdessen einer Bewegung großer Amplitude entlang der Isomerisierungscoordinate zugeschrieben, da dies nach Kapitel 1 ebenfalls zu einer starken Reduktion der Emissionswahrscheinlichkeit führen kann. Im Laufe dieses ca. 70-100 fs dauernden Prozesses erholt sich die Absorption des Grundzustands noch nicht, da in den transienten Absorptionsspektren für das Ausbleichen des Grundzustands keine schnelle Zeitkonstante zu sehen ist. Dem breiten Emissionsspektrum, welches zu der 0.8 ps Zeitkonstante gehört, wird die Entleerung des elektronisch angeregten Zustands durch interne Konversion in einen heißen Grundzustand zugeordnet. Die spektrale Signatur der 4 ps Komponente der Absorptionsspektren - Absorptionsabnahme auf der langwelligen Seite des NA Absorptionsspektrums und Absorptionszunahme hin zum Absorptionsmaximum - bedeutet eine Relaxation dieses heißen Grundzustands entweder zurück in den trans- oder in den cis-Grundzustand.

Der Vergleich von NA mit Azobenzol offenbart eine bemerkenswerte Ähnlichkeit

in der Dynamik beider Moleküle. Beide Systeme besitzen in der Emission das gleiche biphasische Verhalten, auf welches in der transienten Absorption die Relaxation eines heißen Grundzustands folgt. Der einzige Unterschied besteht in den um etwa den Faktor drei längeren Zeitkonstanten für das unsubstituierte Azobenzol. Dies ist sehr erstaunlich, da eine derart große Änderung der elektronischen Struktur durch hinzufügen von Substituenten eine ausgeprägtere Änderung des Verhaltens erwarten ließ. Es scheint, daß ein biphasisches Verhalten eine generelle Eigenschaft von Azobenzol und unabhängig von Substituenten ist. Die Dynamik von Azobenzol wird also durch Substituenten nicht wesentlich beeinflußt. Dies ist beispielsweise relevant für die Interpretation der Ergebnisse von Experimenten, in welchen Azobenzol als Schaltermolekül verwendet wird, da hierbei die zu schaltenden Moleküle als Substituenten angesehen werden können.

3 Isomerisierung von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol

4 Untersuchung der Primärreaktion von Bakteriorhodopsin

4.1 Übersicht

Das *Halobacterium Salinarum*, welches zur Gruppe der Archaeen gehört, lebt in warmen, stark salzhaltigen Gewässern, die einer hohen Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind [73]. Zur Gewinnung von Energie aus Licht und von Information aus dessen spektraler Zusammensetzung besitzt es in seiner Zellmembran vier verwandte Retinalproteine. Es handelt sich hierbei um Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin und Sensorrhodopsin I und II.

Die Sensorrhodopsine sorgen dafür, daß die Bakterien gefährliches ultraviolettes Licht meiden und Bereiche mit für sie günstigem Licht zwischen 500 nm und 650 nm aufsuchen. Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin fungieren als lichtgetriebene Protonen- bzw. Chloridpumpen. Protonen werden aus der Zelle hinaus- und Chloridionen in die Zelle hineintransportiert. Durch den so entstehenden elektrochemischen Protonengradienten wird die Synthese von Adenosin Triphosphat (ATP) angetrieben. Der Transport von Chloridionen dient der Aufrechterhaltung der Iso-Osmolarität der Zelle.

Aus dieser Gruppe von Proteinen ist Bakteriorhodopsin (BR) das bisher am intensivsten untersuchte und ist daher das Musterbeispiel lichtgetriebener Membranproteine. BR besteht aus 248 Aminosäuren und enthält als einzigen Chromophor ein Retinalmolekül. Das Retinal ist über eine protonierte Schiffische Base an das Lysin 216 der Proteinsequenz von BR gebunden (Abb. 4.1) und befindet sich in seiner funktional aktiven, lichtadaptierten Form im all-trans-Zustand. Nach Photoanregung isomerisiert das Retinal in den 13-cis-Zustand und initiiert damit einen thermisch getriebenen Zyklus mit mehreren spektroskopisch unterscheidbaren Intermediaten (J, K, L, M, N, O). Im Laufe dieses Zyklus wird das Proton der Schiffischen Base an den extrazellulären Kanal abgegeben und ein neues Proton aus dem Zellinneren aufgenommen. Während der Zyklusdauer von ~ 10 ms kehrt das Retinal wieder in den trans-Zustand zurück.

Das Retinal in BR besitzt sechs konjugierte Doppelbindungen und kann daher prinzipiell an verschiedenen Stellen isomerisieren (Abb. 4.1). In der Tat ist die Photoisomerisierung des *freien* Retinals in Lösung weder sehr selektiv noch sehr effizient. Beispielsweise ist in Methanol und Hexan die Quantenausbeute der Isomerisierung in die Zustände 7-cis, 9-cis, 11-cis und 13-cis zusammen $< 15\%$ [74]. Dagegen ist im BR-Proteingerüst die Isomerisierung des Retinals vom trans- in den 13-cis-Zustand mit einer Quantenausbeute von ~ 0.6 sehr effizient [75–79]. Dem Protein wird dabei

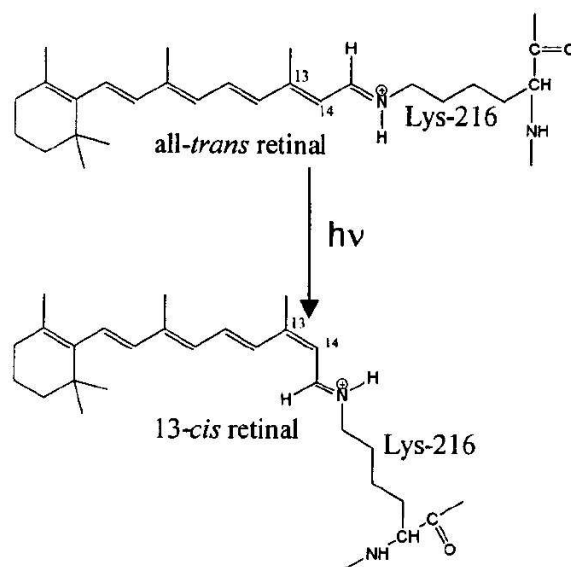


Abbildung 4.1: Retinal mit protonierter Schiffscher Base. Nach Absorption eines Photons isomerisiert das Retinal um die $C_{13} = C_{14}$ Bindung.

eine katalytische Rolle zugeschrieben [79].

Die Dynamik dieses ersten Schritts des Photozyklus war der Inhalt vieler transienter Absorptionsexperimente [75, 80–87]. In frühen Untersuchungen [75, 80, 81] wurde nach optischer Anregung für den ersten angeregten Zustand S_1 eine Dynamik im Subpikosekundenbereich gefunden. Spätere transiente Absorptionsexperimente konnten die ultraschnelle Dynamik von BR mit größerer Genauigkeit auflösen. Unmittelbar nach Photoanregung entsteht im Spektrum ein breites, transientes Loch, dessen Amplitude für ca. 0.2 ps konstant bleibt [83]. Für die initiale Dynamik des angeregten Zustands wird ein zweiphasiges Verhalten mit Zeitkonstanten von < 150 fs und ~ 450 fs beobachtet [82, 86]. Studien mit hoher Zeitauflösung finden außerdem ein oszillatorisches Verhalten des transienten Absorptionssignals auf Grund von Wellenpaketsbewegungen auf den Potentialflächen des angeregten Zustands und des Grundzustands [87–89]. Einhergehend mit dem Zerfall des angeregten Zustands sieht man innerhalb ~ 450 fs das Erscheinen einer rotverschobenen Absorptionsbande, welche den Aufbau des J Intermediats kennzeichnet [82, 85, 86]. Diese Absorptionsbande zerfällt in 3 - 5 ps wieder und zeigt damit den Übergang in den K Grundzustand an [75, 78].

Bei transienten Absorptionsmessungen an BR ist es schwierig, die Vorgänge in den einzelnen Zuständen voneinander zu unterscheiden. Im Bereich der maximalen Fluoreszenz von ca. 650 nm - 850 nm wird die stimulierte Emission zum großen Teil von Absorptionsbeiträgen des elektronisch angeregten Zustands und der frühen Intermediate überdeckt [83, 85, 86]. Es ist daher nur schwer möglich, die Signal-

beiträgen des elektronisch angeregten Zustands, des Grundzustands und der Intermediate zu trennen. Um die Dynamik des elektronisch angeregten Zustands selektiv zu beobachten, ist es daher notwendig, die Fluoreszenz nach Anregung zeitaufgelöst zu messen.

Bisher wurden jedoch nur zwei zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen des primären Schritts der Photoreaktion von BR veröffentlicht [90, 91]. In beiden Experimenten wurde die Up-Conversion Technik verwendet. Du et al. [90] fanden drei Zeitkonstanten mit Werten von 90-240 fs, 0.6-0.9 ps und 9.0-13.0 ps. Die Amplitude der dritten Zeitkonstante wurde mit bis zu 25% angegeben. Es konnte aber nicht sichergestellt werden, daß die Probe zwischen zwei Anregungsimpulsen vollständig ausgetauscht wurde. Haacke et al. [91] beobachteten nur zwei Zeitkonstanten. Die kurze Zerfallszeit wächst mit zunehmender Wellenlänge von 150 fs auf 400 fs an. Die lange Zeitkonstante wird mit ~ 10 ps angegeben und hat eine Amplitude von 4%. Allerdings ist die Zeitauflösung dieses Experiments nur ca. 250 fs, so daß die Zeitverläufe im Subpikosekundenbereich nicht besser aufgelöst werden können. Obwohl beide Experimente ähnliche Ergebnisse aufweisen, unterscheiden sie sich doch deutlich in der Dynamik des Subpikosekundenbereichs und der Amplitude der langen Zeitkonstante.

Da diese Abweichungen voneinander und von den Ergebnissen transientser Absorptionsmessungen dringend der Klärung bedürfen, wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an BR unter klar definierten Bedingungen durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, die Probe zwischen zwei Anregungsimpulsen auszutauschen und die zeitliche und spektrale Korrektur der Meßdaten so akkurat wie möglich durchzuführen. Im Laufe der Experimente wurde in mehreren Meßreihen die Anregungsdichte zwischen ~ 0.07 und ~ 40 Photonen pro BR-Molekül variiert.

4.2 Fluoreszenzmessung mit niedriger Anregungsdichte

Zur Gewährleistung von Anregungsbedingungen, die den in der Natur vorkommenden – soweit dies in zeitaufgelösten Experimenten überhaupt zu erreichen ist – möglichst nahe sind, wurden relativ niedrige Anregungsdichten zwischen ~ 0.07 und ~ 1 Photonen pro BR-Molekül gewählt. In diesem Bereich wurden keine systematischen Abweichungen der Ergebnisse der einzelnen Messungen voneinander gefunden. Wegen des besseren Signal- zu Rauschverhältnisses wird hier bei der Darstellung der Daten die Messung mit der Anregungsdichte von ~ 0.3 Photonen pro Molekül der Messung mit der Anregungsdichte von ~ 0.07 Photonen pro Molekül vergezogen. Nach Anregung mit Impulsen einer Wellenlänge von ~ 565 nm emittiert BR eine spektral breite und kurzlebige Fluoreszenz (Abb. 4.2). Im Spektralbereich zwischen 630 nm und 900 nm zerfällt die Fluoreszenz auf der Subpikosekunden- bis Pikosekundenzeitskala. Während im kurzwelligeren Spektralbereich die Spektren sehr schnell zerfallen, ist die Lebensdauer im längerwelligen Spektralbereich etwas größer (~ 0.5 ps). Zusätzlich gibt es noch eine Komponente mit einer Lebensdauer von mehreren Pikosekunden

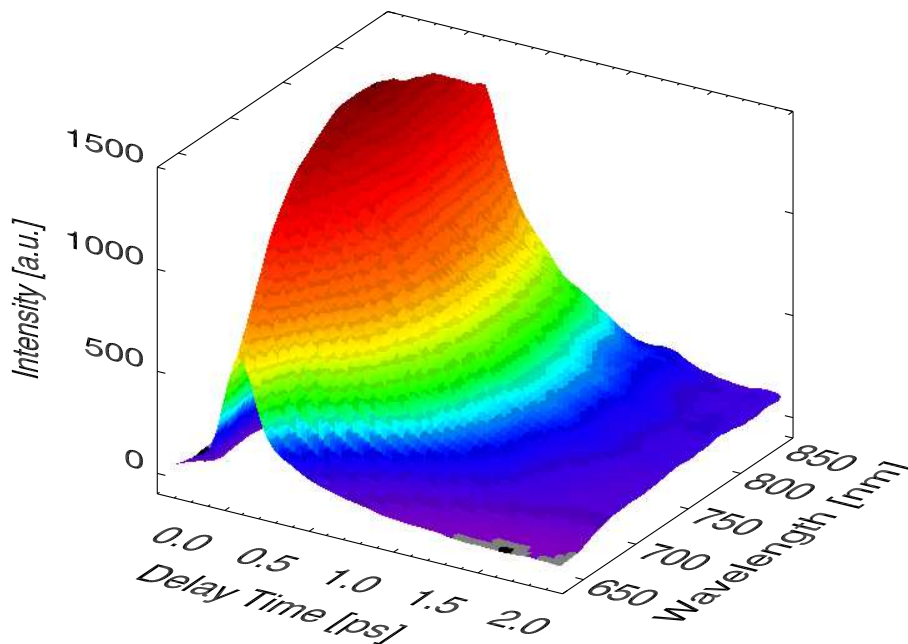


Abbildung 4.2: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von BR, Überblick (niedrige Anregungsdichte, ~ 0.3 Photonen pro BR-Molekül).

und sehr kleiner Amplitude.

Diesen Zerfallsmustern überlagert ist ein dynamischer Stokes-Shift. In der für einen Stokes-Shift üblichen Darstellung in Abb. 4.4 sind die Wellenlängen maximaler Emission zu jedem Meßzeitpunkt gegen die Verzögerungszeit aufgetragen. Sie verschieben sich innerhalb weniger 100 fs von ~ 630 nm hin zu ~ 750 nm. In einer anderen Darstellung ist der Stokes-Shift ebenfalls zu erkennen. Im Höhenlinienbild der Fluoreszenzspektren für frühe Meßzeiten (Abb. 4.3) sind die Emissionsmaxima bei jeder Wellenlänge gegen die Zeit aufgetragen. Auch hier ist eine Verschiebung von ca. 100 fs in Form eines verzögerten Anstiegs zu sehen, welche im Bereich von 630 nm bis 750 nm besonders ausgeprägt ist.

Für eine globale Anpassung der Daten wird eine Testfunktion mit mehreren Zerfällen verwendet. Der dynamische Stokes-Shift wird dadurch simuliert, daß der Zeitnullpunkt als freier Parameter gewählt wird. Eine solche Behandlung der Daten kann wie schon bei der Auswertung der Daten von 4-Nitro-4'-(Dimethylamino)-Azobenzol (siehe Kapitel 3) nur eine Näherung darstellen, da bei der Anregung einer Probe in den niedrigsten elektronischen Zustand ein Ratenmodell mit mehreren Zerfallskonstanten - insbesondere unter Einbeziehung eines dynamischen Stokes-Shifts - nicht gerechtfertigt ist. Um einen Überblick über die Dynamik der Fluoreszenz zu ermöglichen, wird ein solches Modell hier dennoch benutzt.

Die globale Anpassungsfunktion liefert drei Zeitkonstanten von ~ 50 -150 fs, ~ 450 fs und ~ 3 -10 ps. Da dem Zerfall der Fluoreszenz im kurzwelligen Spektralbe-

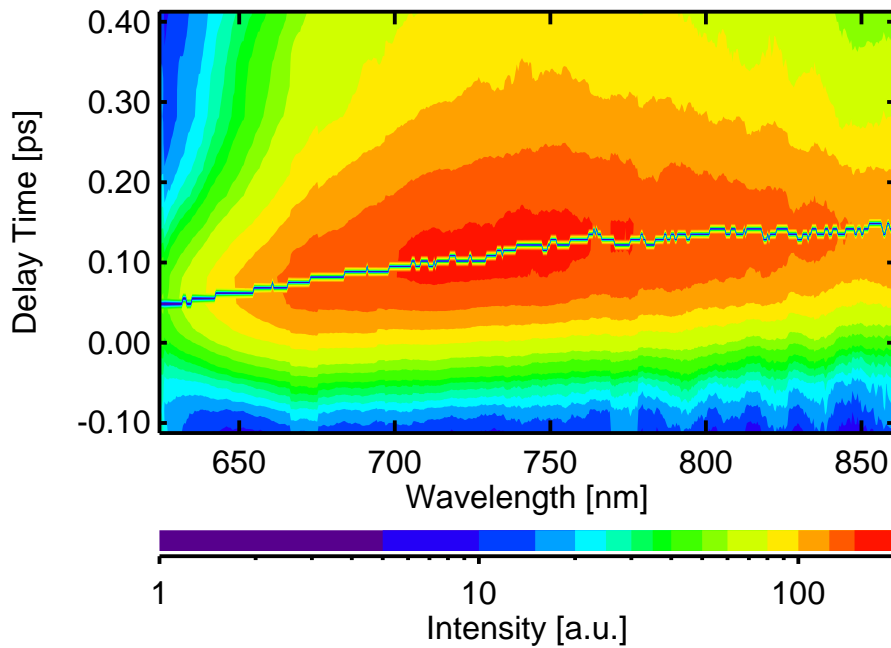


Abbildung 4.3: Höhenlinienbild der Fluoreszenzspektren von BR (niedrige Anregungsdichte). Die Linie zeigt die Lage der Fluoreszenzmaxima bei jeder Wellenlänge.

reich ein dynamischer Stokes-Shift überlagert ist, kann die schnellste Zeitkonstante nicht genauer angegeben werden. Deren Amplitudenspektrum hat am kurzwelligen Rand der Emission seinen höchsten Wert und nimmt zu größeren Wellenlängen hin ab. Die zweite Zeitkonstante ist mit ~ 450 fs deutlich länger als die Zeit des dynamischen Stokes-Shifts, ein Ratenmodell ist hier eher angebracht. Das zugehörige Amplitudenspektrum besitzt ein Maximum bei ca. 750 nm, der Wellenlänge des Maximums des statischen Fluoreszenzspektrums. Das Amplitudenmaximum der letzten Zeitkonstante liegt noch weiter im langwelligen Teil des Spektrums. Da die Amplitude sehr klein ist ($< 5\%$), ist eine genauere Angabe der Zerfallszeit nicht möglich. Da diese Zeitkonstante in etwa mit der Fluoreszenzlebensdauer von BR-Molekülen mit sterisch behindertem Retinal übereinstimmt [91, 92], wird sie nicht der Dynamik von voll funktionsfähigem BR sondern inaktiven BR-Molekülen zugeschrieben.

In Kapitel 1 wurden unter (i)-(iii) die für ultraschnelle Photoreaktionen charakteristischen Eigenschaften der zugehörigen Fluoreszenzspektren aufgelistet. In den BR-Daten sind alle diese Eigenschaften wiederzufinden. Die Maxima der Fluoreszenzspektren verschieben sich innerhalb ca. 200 fs (dynamischer Stokes-Shift). Gleichzeitig findet ein Zerfall der integrierten Fluoreszenzintensität statt (Reduktion der Emissionswahrscheinlichkeit auf Grund einer Bewegung großer Amplitude). Interne Konversion in den Grundzustand innerhalb 0.45 ps beendet schließlich die Emission nahezu.

Die letzten beiden Beobachtungen treten auch in transienten Absorptionsexperi-

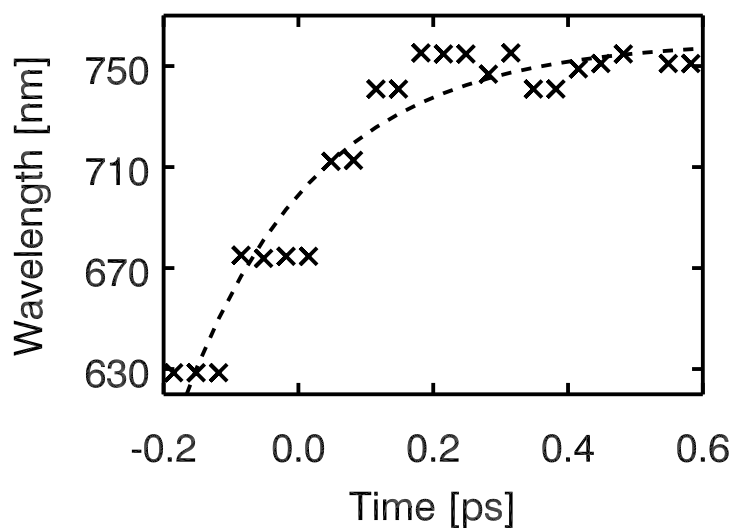


Abbildung 4.4: Dynamischer Stokes-Shift der Fluoreszenzspektren von BR (niedrige Anregungsdichte). Das stufenförmige Verhalten der Daten ist das Resultat eines nicht vollständig korrigierbaren Meßartefakts. Als Hilfestellung für die Betrachtung wurde eine gestrichene Linie eingezeichnet.

menten in Form eines biexponentiellen Verhaltens mit Zeitkonstanten von 100 - 200 fs und ~ 500 fs auf [82, 83, 86]. Überraschenderweise wurde der hier gefundene dynamische Stokes-Shift in den bisherigen Veröffentlichungen experimenteller Daten noch nicht ausdrücklich erwähnt. In der Tat wurde in vielen transienten Absorptionsexperimenten ein nahezu instantaner Anstieg der Fluoreszenz beobachtet [83, 85, 86]. Es wurden jedoch auch Anzeichen für einen dynamischen Stokes-Shift gefunden. In den Daten von Ye et al. [93] ist im Spektralbereich von 800 nm - 950 nm ein verzögerter Anstieg der stimulierten Emission von ~ 20 fs zu sehen. Da sich aber in transienten Absorptionsexperimenten bei BR im Bereich des Fluoreszenzmaximums zu frühen Verzögerungszeiten die Absorption des elektronisch angeregten Zustands und die stimulierte Emission zum Teil gegenseitig kompensieren [83, 85, 86] und beide Beiträge ein unterschiedliches zeitliches Verhalten aufweisen können, ist das Herausarbeiten eines Stokes-Shifts aus Absorptionsdaten kaum möglich.

In den beiden bisher veröffentlichten Fluoreszenzexperimenten [90, 91] wurde offensichtlich kein besonderer Nachdruck auf den Nachweis eines Stokes-Shifts gelegt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß ein solcher Effekt zwar in den Daten vorhanden war, aber nicht entdeckt wurde. Ein dynamischer Stokes-Shift wird hier das erste Mal explizit gezeigt.

Im Folgenden soll dieser Stokes-Shift mit den im Rahmen theoretischer Mo-

delle gemachten Vorhersagen zur Primärreaktion von BR verglichen werden. Diese Modelle können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Zwei-Zustands Modelle [82, 83, 89, 94–97] benötigen zur Beschreibung der Photodynamik von BR den Grundzustand und den ersten angeregten Zustand. In den Drei-Zustands Modellen [85, 98] wird zusätzlich die Potentialfläche eines zweiten angeregten Zustands eingeführt, welche mit derjenigen des ersten angeregten Zustands wechselwirkt. Die Zwei-Zustands Modelle können darüberhinaus durch die Art und Weise unterschieden werden, in der die Dynamik des angeregten Zustands behandelt wird.

Das einfachste Zwei-Zustands Modell ist das Ein-Moden Modell, in welchem die Torsion um die $C_{13} = C_{14}$ Doppelbindung die einzige Reaktionskoordinate darstellt. Im inertialen Fall [96] ist der Zerfall des elektronisch angeregten Zustands schnell gegenüber der Schwingungsrelaxation. Im überdämpften Fall [82, 83] (Abb. 4.5 a) verläßt das im angeregten Zustand erzeugte Wellenpaket den Franck-Condon Bereich in weniger als 0.2 ps. Im Laufe dieser Bewegung relaxiert die Schwingungsanregung des angeregten Zustands zumindest teilweise. Im Zwei-Moden Modell [89, 94, 97] (Abb. 4.5 b) gibt es nicht nur eine niederfrequente Torsionskoordinate sondern auch eine hochfrequente Streckkoordinate. In einer initialen Bewegung in Form einer Relaxation von C-C Bindungen verläßt das Wellenpaket den Franck-Condon Bereich in Richtung eines stationären Punkts. Das Wellenpaket bewegt sich dann innerhalb von ca. 0.5 ps entlang der Torsionskoordinate in Richtung eines konischen Schnitts. Das Viel-Moden Modell [95] (Abb. 4.5 c) beinhaltet neben einer niederfrequenten Torsionskoordinate mehrere hochfrequente Moden. Entlang einer Reaktionskette, in deren Verlauf sukzessive jeweils eine andere Schwingungsordinate angeregt wird, wird der isomerisierte Zustand innerhalb von ca. 3.5 ps erreicht.

In den Drei-Zustands Modellen [85, 98] (Abb. 4.5 d) existieren aufgrund von Wechselwirkungen zwischen dem ersten und dem zweiten elektronisch angeregten Zustand Barrieren entlang der Torsionskoordinate. Nach Photoanregung in einen relativ flachen Franck-Condon Bereich wird die Barriere in Richtung des konischen Schnitts innerhalb ca. 0.5 ps überwunden. Wegen des recht flachen Franck-Condon Bereichs und der Notwendigkeit, vor dem Erreichen des reaktiven Bereichs eine Barriere zu überwinden, wird in diesem Modell kein Stokes-Shift erwartet. Aus diesem Grund paßt der hier gefundene dynamische Stokes-Shift nicht in dieses Modell.

Andererseits ist wiederum für den überdämpften Fall des Zwei-Zustands Modells auf jeden Fall ein dynamischer Stokes-Shift auf der Zeitskala der Bewegung des Wellenpakets aus dem Franck-Condon Bereich erforderlich. Abhängig von der initialen spektralen Verteilung und der Relaxation entlang der hochfrequenten Streckkoordinate kann auch das Zwei-Zustands, Zwei-Moden Modell die Erklärung für einen dynamischen Stokes-Shift liefern. Schließlich kann das Auftreten eines dynamischen Stokes-Shifts auch durch Modelle erklärt werden, welche einen Verzweigungsmechanismus beinhalten. Ein solcher Ansatz würde mehrere unterschiedliche Reaktionskoordinaten erfordern [86]. Zum Beispiel könnte eine Verzweigung in eine reaktive und eine nicht reaktive Schwingungsordinate zu einem dynamischen Stokes-Shift auf der Zeitskala der Relaxation der nicht reaktiven Schwingung führen, während der

4 Untersuchung der Primärreaktion von Bakteriorhodopsin

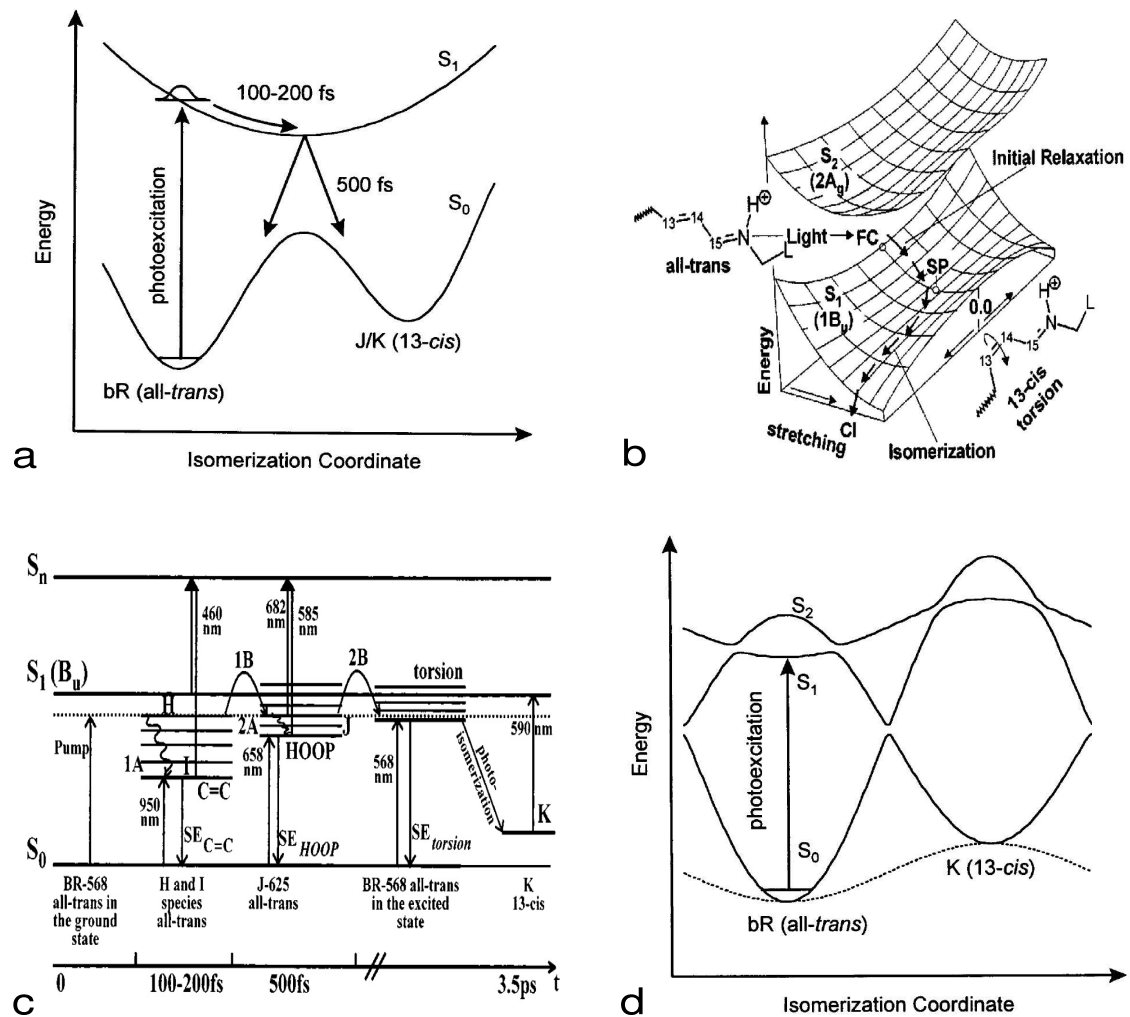


Abbildung 4.5: Reaktionsmodelle der Primärreaktion von BR nach Photoanregung. a)-c) Zwei-Zustands Modelle: a) überdämpfter Fall [82, 83], b) Zwei-Moden Modell [89, 94, 97], c) Viel-Moden Modell [95]. d) Drei-Zustands Modell [85, 98].

Weg über die reaktive Koordinate in die Bildung der isomerisierten Konfiguration münden würde.

Die einfache Betrachtung der hier dargestellten Daten erlaubt jedoch noch nicht die eindeutige Festlegung eines Mechanismus für die Primärreaktion von BR. Hierzu wären weitergehende theoretische Berechnungen auf der Basis der verschiedenen Modelle im Vergleich mit den experimentellen Daten notwendig. Es soll hier lediglich festgehalten werden, daß zeitaufgelöste Fluoreszenzdaten solche Berechnungen erleichtern würden, da im Gegensatz zu transienten Absorptionsexperimenten die Absorption des angeregten Zustands nicht berücksichtigt werden muß.

4.3 Fluoreszenzmessung mit hoher Anregungsdichte

Bei Anregung von BR mit kurzen Laserimpulsen sehr hoher Intensität sind Mehrphotonen- und/oder Mehrstufenprozesse zu erwarten. Insbesondere sind nach Anregung bei einer Wellenlänge von 565 nm mittels Zweiphotonenabsorption über eine resonante Zwischenstufe ($S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_n$) elektronisch angeregte Zustände im spektralen Bereich von 280 nm effizient zu erreichen. In der Tat wurden bereits Anzeichen für solche Prozesse in Fluoreszenz- [99] und Absorptionsexperimenten [100] gefunden.

Mit der Besetzung höher angeregter Zustände S_n sollte sich auch die Emissionsdynamik von BR ändern. Zur Überprüfung dieser These wurde in einer Reihe zeitaufgelöster Messungen die Anregungsdichte in mehreren Schritten von 0.07 auf 40 Photonen pro BR-Molekül gesteigert. Bei Anregungsdichten zwischen ~ 0.07 und ~ 1 Photon pro BR-Molekül werden keine Abweichungen von den oben beschriebenen Resultaten mit ~ 0.3 Photonen pro BR-Molekül gefunden. Mit weiter steigender Anregungsdichte zeigen sich indessen zunehmende Änderungen des spektralen und zeitlichen Verhaltens.

In Abb.4.6 sind die Zeitverläufe bei drei verschiedenen Wellenlängen (650 nm, 730 nm und 800 nm) auf einer logarithmischen Intensitätsskala gegen die (lineare) Verzögerungszeit aufgetragen. Die durchgezogene Linie ist das Fluores-

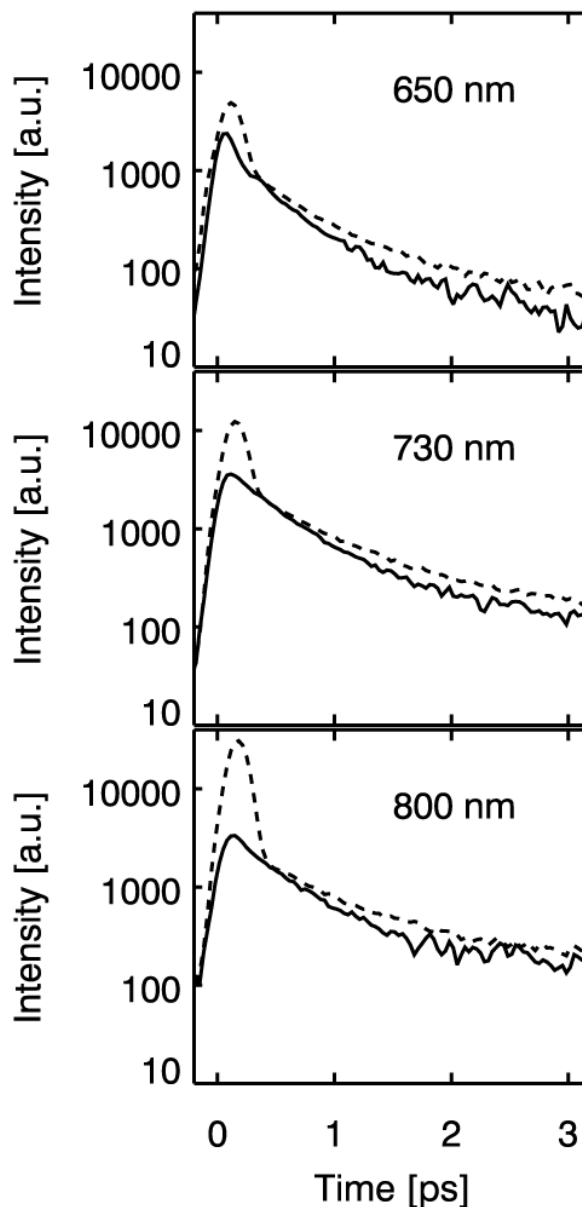


Abbildung 4.6: Zeitverläufe der Fluoreszenz von BR bei verschiedenen Wellenlängen und Anregungsdichten (durchgezogene Linie: 0.3 Photonen pro Molekül, gestrichene Linie: 40 Photonen pro Molekül). Die Zeitverläufe wurden bei einer Verzögerungszeit von 0.3 ps aufeinander normiert. (a) 650 nm. (b) 730 nm. (c) 800 nm.

zenzsignal bei einer geringen Anregungsdichte von ~ 0.3 Photonen pro Molekül, während die gestrichene Linie das Fluoreszenzsignal bei einer hohen Anregungsdichte von ~ 40 Photonen pro Molekül ist. Es werden zwei signifikante Änderungen beobachtet:

(i) Mit zunehmender Anregungsdichte steigt die Amplitude der schnellsten Zeitkonstante (< 0.15 ps) stark an. Dieser Effekt nimmt zu größeren Wellenlänge hin zu. Die Emissionsmaxima verschieben sich dabei geringfügig zu späteren Verzögerungszeiten (siehe Abb. 4.6, gestrichene Linie).

(ii) Mit zunehmender Anregungsdichte verlängert sich die zweite Zerfallszeit von ~ 0.45 ps auf ~ 0.7 ps (siehe ebenfalls Abb. 4.6, gestrichene Linie). Die spektrale Signatur des Amplitudenspektrums dieser Zeitkonstante ändert sich dabei nicht.

Diese Effekte lassen sich am besten durch Anregungsprozesse in höhere Zustände erklären. Zum einen können strahlende Übergänge zwischen höher angeregten Zuständen ($S_n \rightarrow S_m$) auftreten. Da der Zerfall höher angeregter Zustände durch interne Konversion sehr schnell sein sollte, wird eine kurzlebige, zeitlich leicht verschobene Fluoreszenz erwartet. Wegen den im allgemeinen relativ zum $S_1 \rightarrow S_0$ Übergang kleineren Energielücken zwischen höher angeregten Zuständen, sollte das Emissionsspektrum zu größeren Wellenlängen hin verschoben sein. In der Tat ist dies in den Fluoreszenzspektren mit hoher Anregungsdichte zu sehen. Die Amplitude einer kurzlebigen und rotverschobenen Komponente nimmt mit wachsender Anregungsdichte deutlich zu (Abb. 4.6).

Zum anderen müssen Moleküle, welche vom S_1 Zustand in höher angeregte Zustände gebracht werden, auch wieder in diesen Zustand zurückkehren. Da die Repopulation des ersten angeregten Zustands durch interne Konversion eine gewisse Zeit benötigt, sollte eine scheinbare Verlängerung der Lebensdauer zu sehen sein. Tatsächlich tritt mit steigender Anregungsdichte eine Verlängerung der Lebensdauer von 0.45 ps auf 0.7 ps auf (Abb. 4.6). Da dabei das zugehörige Spektrum gleich bleibt, kann davon ausgegangen werden, daß auch wirklich der Zerfall des S_1 Zustands beobachtet wird.

4.4 Zusammenfassende Bemerkung

Die Photoprozesse in BR werden seit über 30 Jahren untersucht. Obwohl Übereinstimmung darin besteht, daß nach Photoanregung eine Isomerisierung des Retinals stattfindet, ist der Ablauf dieser Primärreaktion noch immer nicht detailliert aufgeklärt. Ein großer Teil der experimentellen Information basiert auf transienten Absorptionmessungen. Da sich bei transienten Absorptionmessungen die Signalbeiträge von stimulierter Emission und Absorption des angeregten Zustands und der frühen Intermediate überlagern, erweist sich ein Vergleich mit theoretischen Modellen als schwierig. Dagegen sind die Anforderungen an eine theoretische Auswertung von Fluoreszenzdaten viel geringer, da nur der elektronisch angeregte Zustand und der Grundzustand zum Signal beitragen.

In dieser Arbeit wurden erstmals zeitaufgelöste Fluoreszenzexperimente an BR

bei unterschiedlichen Anregungsdichten durchgeführt. Aufgrund der zuvor gemachten Überlegungen können die Änderungen der zeitaufgelösten Spektren bei hoher Anregungsdichte Mehrphotonenabsorption zugeordnet werden. Dies erlaubt es, einige der in der Literatur gefundenen Abweichungen zu erklären. Im Bereich niedriger Anregungsdichte wurde hier das erste Mal ein dynamischer Stokes-Shift gefunden. In Übereinstimmung mit anderen Experimenten wurden Zeitkonstanten von < 0.15 ps und 0.45 ps bestimmt.

5 Untersuchung der Primärreaktion von Proteorhodopsin

5.1 Übersicht

Bis vor einigen Jahren waren rhodopsinartige Proteine nur als Bestandteil von Archaeen (z.B. Bakteriorhodopsin (BR), Halorhodopsin, Sensorrhodopsin I und II) und Eukaryonten (z.B. Photorezeptorzellen der Retina des Auges) bekannt. Kürzlich jedoch wurde das Proteorhodopsin (PR) als neues Mitglied der retinalbindenden Proteinfamilie des Typs I entdeckt [101, 102]. Erstmals wurde es durch Gensequenzierung von natürlich in Meerwasser vorkommenden Planktonbakterien gefunden. Die Aufschlüsselung des Genoms von γ -Proteobakterien ergab eine sehr große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von Proteorhodopsin und Rhodopsinen aus Archaeen. In den folgenden Jahren wurde weltweit eine große Zahl homologer Sequenzen in verschiedenen Planktonbakterienarten identifiziert [103–105] (siehe Abb. 5.1).

Ebenso wie BR ist auch PR eine lichtgetriebene Protonenpumpe. Der auf diese Weise entstehende Protonengradient könnte - wie auch bei BR - der Sicherung des Energiebedarfs der Zelle dienen. Die weite Verbreitung von PR in Meeresbakterien würde in diesem Fall den Schluß nahelegen, daß es sich bei diesem Mechanismus um eine alternative und bisher unbekannte Art der Energiegewinnung durch Photosynthese handeln könnte.

Nach Photoanregung durchläuft PR einen Photozyklus, welcher demjenigen in BR sehr ähnlich ist. Die verschiedenen Intermediate werden mit K, M, N und O bezeichnet [106–110]. Der primäre Protonenakzeptor Asp97 des PR-Moleküls besitzt einen pK_a -Wert zwischen 7.1 [107] und 7.68 [108]. Der Protonentransport ist daher abhängig vom pH -Wert. In der natürlichen, leicht basischen Umgebung von PR werden Protonen aus dem Zellinneren nach außen transportiert [107, 108]. In saurer Umgebung findet dagegen kein Protonentransport [111] oder gar ein zelleinwärts gerichteter Protonentransport statt [108]. In Abhängigkeit vom pH -Wert verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 518 nm ($pH = 11.5$) nach 539 nm ($pH = 4.0$) [108]. Dieser Effekt wird dem Protonierungsgrad des primären Protonenakzeptors Asp97 zugeschrieben [111].

Wie in allen anderen rhodopsinartigen Proteinen ist der Schlüsselschritt des Photozyklus auch in PR die Photoisomerisierung des Retinals. Das Verhältnis von all-trans zu 13-cis Retinal in PR beträgt bei basischem pH ca. 60% zu 40% im lichtadaptierten und ca. 80% zu 20% im dunkeladaptierten Zustand. Bei saurem pH tritt keine Licht-/Dunkeladaption auf, das Verhältnis von von 13-cis zu all-trans Retinal ist stets ca. 80% zu 20% [108]. Licht- und dunkeladaptiertes PR zeigt im Gegensatz

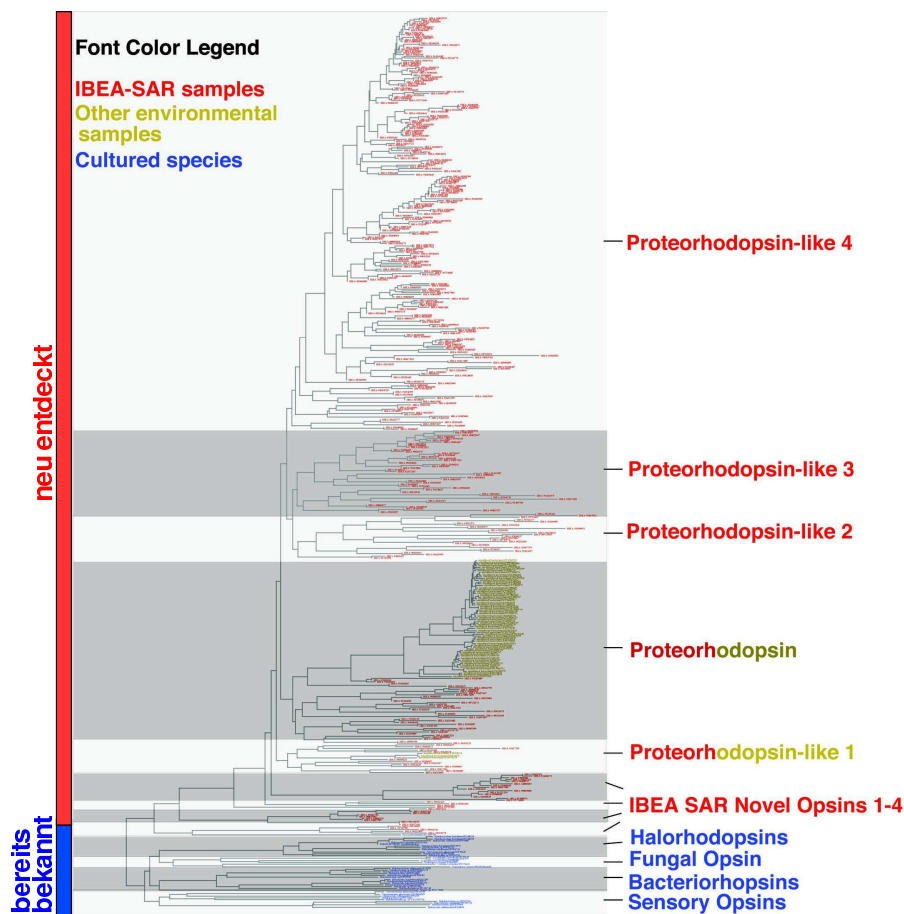


Abbildung 5.1: Phylogenetischer Stammbaum rhodopsinartiger Gene (nach Venter et al. [105])

zu BR keine Verschiebung des Absorptionsmaximums, lediglich der Extinktionskoeffizient ist bei Lichtadaption ca. 10% niedriger [108].

Da die Photoisomerisierung des Retinals von solch großer Bedeutung für die Funktionalität von PR ist, wurde bereits von Huber et al. [112] ein transientes Absorptionsexperiment mit einer Zeitauflösung im Femtosekundenbereich an PR bei $pH = 9$ und $pH = 6$ durchgeführt. Es wurden drei Zeitkonstanten von < 0.2 ps, ~ 0.4 ps und ~ 8 ps bei basischem pH und < 0.2 ps, ~ 0.7 ps und ~ 15 ps bei saurem pH bestimmt. Die erste Zeitkonstante (< 0.2 ps) wird analog der Modellbildung bei BR [82, 83, 89, 94, 95, 97] einem schnellen Verlassen des Franck-Condon Bereichs entlang einer Reaktionskoordinate (z.B. Relaxation von C-C Bindungen) zugeordnet.

Für das Auftreten der beiden anderen Zeitkonstanten sind zwei Erklärungen vorstellbar: (i) In der PR Probe könnten zwei unterschiedliche Spezies mit unterschiedlichem spektralen und dynamischen Verhalten existieren. Da sich das Retinal in PR stets teilweise im 13-cis und teilweise im all-trans Zustand befindet und beide

Zustände ein sehr ähnliches Absorptionsverhalten besitzen [108], könnte möglicherweise auch die 13-cis-Form mit Licht angeregt werden und eine von der all-trans-Form verschiedene Dynamik aufweisen. (ii) Das Verlassen des Franck-Condon Bereichs könnte in PR, wie z.B. bereits für die Isomerisierung des Retinals in Halorhodopsin vorgeschlagen wurde [113], auf unterschiedlichen Reaktionswegen stattfinden (Abb. 5.2). Die konische Durchschneidung (CI) wird entweder direkt (τ_1) oder über einen Zwischenzustand (τ_3) erreicht. Von dort relaxiert das Retinal entweder wieder zurück in den Grundzustand oder isomerisiert und leitet damit den Photozyklus ein (τ_2).

Die pH -Abhängigkeit der zweiten und dritten Zeitkonstante legt nahe, daß die Geschwindigkeit und Effizienz der primären Photoreaktion in BR von der Ladungsverteilung in der Nähe der Schiffsbasis kontrolliert wird.

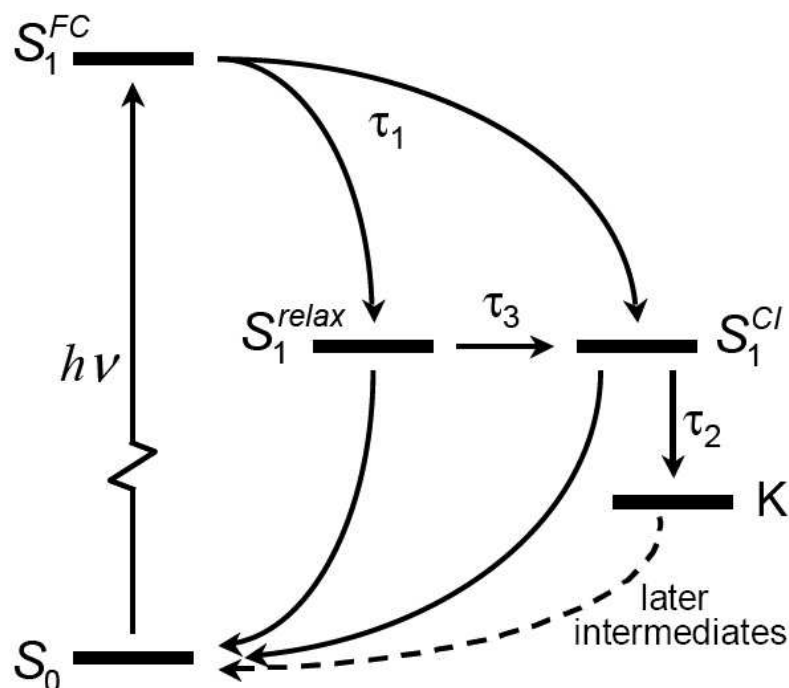


Abbildung 5.2: Energie- und Reaktionsschema der ersten Schritte des PR-Photozyklus nach Huber et al. [112]

5.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung

Die zeitaufgelösten Experimente von Huber et al. [112] wurden mit einer nicht solubilisierten Probe durchgeführt, d.h. die PR-Moleküle sind noch in Membranstücken

der sie exprimierenden *E. coli* Bakterien verankert. Da nicht solubilisierete Moleküle wegen der Streuung des Lichts an den Membranstücken schwerer zu handhaben sind als solubilisierete Moleküle, wurde eine solubilisierete PR Probe bei ihrem natürlichen, leicht basischen pH -Wert von ~ 8.0 sowohl in zeitaufgelöster Emission als auch in transientser Absorption vermessen. Die zeitaufgelösten Emissionsmessungen sind dabei die ersten, die bislang an PR durchgeführt wurden. Es soll getestet werden, ob zwischen beiden Probenformen (solubilisierete und nicht solubilisierete) Unterschiede auftreten. Weiterhin soll durch die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung gezielt die Dynamik des elektronisch angeregten Zustands untersucht werden. Es wurde bei den Messungen darauf geachtet, die Anregungsdichte niedrig genug zu halten, so daß keine Mehrphotoneneffekte, wie in Kapitel 4 beschrieben, vorkommen.

Nach Anregung der Probe mit Impulsen einer Wellenlänge von ~ 525 nm emittiert PR ähnlich wie BR eine spektral breite und kurzlebige Fluoreszenz (Abb. 5.3). Im Spektralbereich zwischen 500 nm und 850 nm zerfällt die Fluoreszenz auf der Subpikosekunden- bis Pikosekundenzeitskala. Anders als bei BR ist bei PR jedoch ein Zerfall im Pikosekundenbereich mit deutlich größerer Amplitude zu beobachten. Zusätzlich gibt es zu späten Verzögerungszeiten noch einen Offset mit kleiner Amplitude. Dieser wird aber, wie schon bei BR, inaktiven PR-Molekülen zugeschrieben [91, 92].

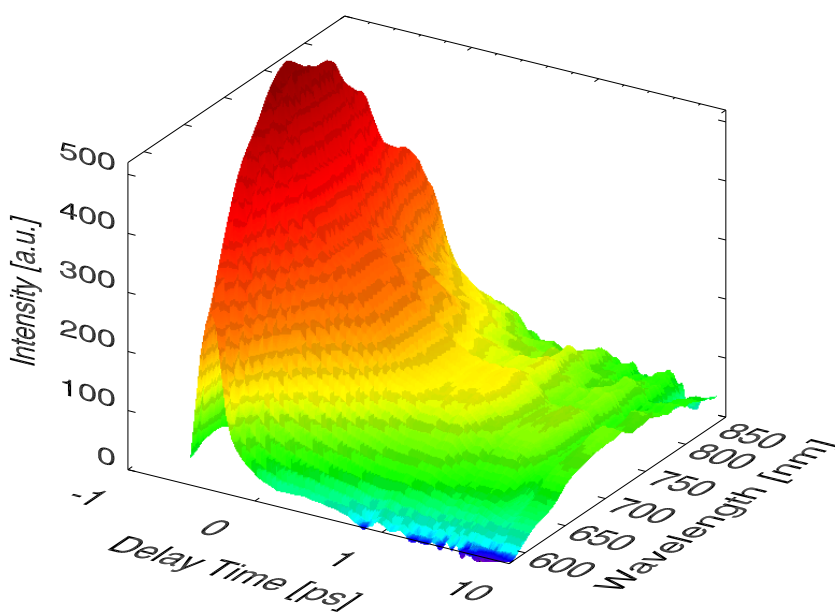


Abbildung 5.3: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von PR, Überblick (niedrige Anregungsdichte, ~ 0.4 Photonen pro Molekül)

Ebenso wie bei BR findet man auch bei PR einen dynamischen Stokes-Shift. Die für einen Stokes-Shift übliche Darstellung in Abb. 5.5 zeigt die Maxima der Emission

für jeden Meßzeitpunkt aufgetragen gegen die Wellenlänge. Innerhalb weniger 100 fs verschieben sie sich von ~ 580 nm hin zu ~ 700 nm. Im Höhenlinienbild der Fluoreszenzspektren für frühe Meßzeiten (Abb. 5.4) sind die Emissionsmaxima bei jeder Wellenlänge gegen die Zeit aufgetragen. Es tritt hier ebenfalls eine Verschiebung von ca. 100 fs in Form eines verzögerten Anstiegs auf.

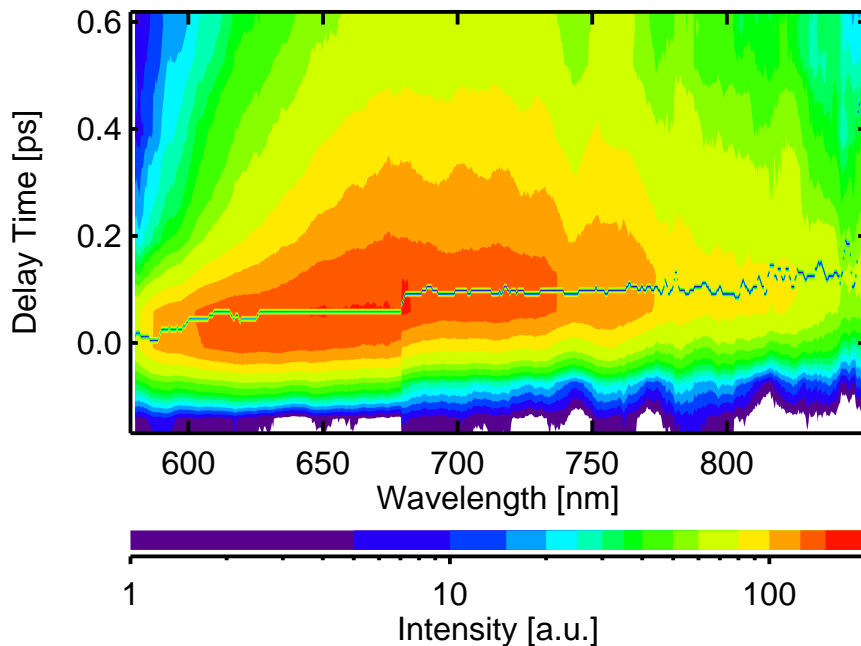


Abbildung 5.4: Höhenlinienbild der Fluoreszenzspektren von PR. Die Linie zeigt die Lage der Fluoreszenzmaxima bei jeder Wellenlänge.

Zur Gewinnung eines Überblicks über die Zerfallsdynamik der Fluoreszenz von PR wird analog zum Vorgehen bei BR eine globale Anpassung der Daten mit einer Testfunktion mit mehreren Zeitkonstanten vorgenommen. Der dynamische Stokes-Shift wird durch einen freien Zeitnullpunktparameter simuliert. Natürlich ist ein solches Vorgehen beim Auftreten eines Stokes-Shifts, wie schon im vorhergehenden Kapitel dargelegt, für frühe Verzögerungszeiten nur eine Näherung der tatsächlichen Dynamik.

Aus der globalen Anpassung ergeben sich drei Zeitkonstanten von ~ 50 -150 fs, ~ 450 fs und ~ 4 ps. Da sich zu frühen Verzögerungszeiten der Zerfall der Fluoreszenz und der dynamische Stokes-Shift überlagern, kann die schnellste Zeitkonstante nicht genauer angegeben werden. Ihre Amplitude ist am kurzwelligen Rand des Spektrums am größten und auf der langwelligen Seite fast verschwunden. Die zweite und die dritte Zeitkonstante besitzen sehr ähnliche Spektren mit Maxima bei ca. 700 nm, deren Amplituden in etwa im Verhältnis 10:3 stehen. Da diese Zeiten deutlich größer als die Dauer des Stokes-Shifts sind, ist ein Ratenmodell für sie als gerechtfertigt anzusehen.

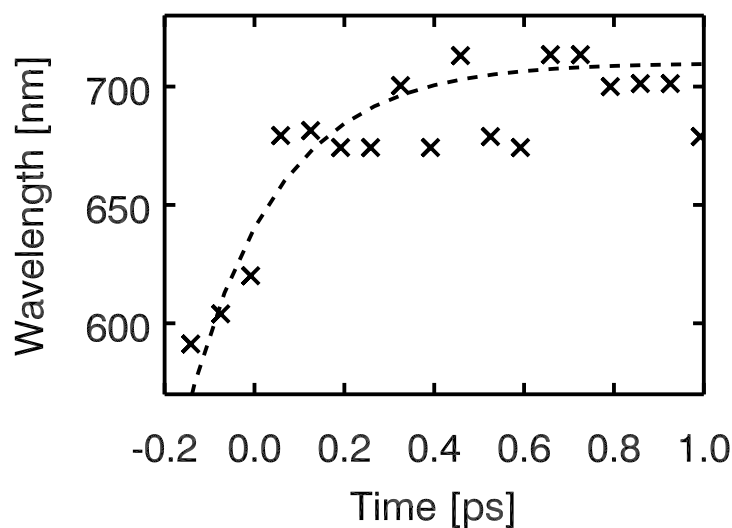


Abbildung 5.5: Dynamischer Stokes-Shift der Fluoreszenzspektren von PR. Das stufenförmige Verhalten der Daten ist das Resultat eines nicht vollständig korrigierbaren Meßartefakts. Als Hilfestellung für die Betrachtung wurde eine gestrichelte Linie eingezeichnet.

Die transienten Absorptionsexperimente an solubilisiertem PR kommen zu den gleichen Ergebnissen wie bereits in Ref. [112] für nicht solubilisiertes PR gezeigt, aber mit besserem Signal- zu Rauschverhältnis. Ebenso stimmen die transienten Absorptionsdaten sehr gut mit den Fluoreszenzdaten überein. Die dritte Zeitkonstante wird für die transiente Absorption zwar global mit ~ 8 ps angegeben, jedoch ergibt eine isolierte Anpassung der Kanäle mit stimulierter Emission in Übereinstimmung mit den Fluoreszenzdaten einen Wert von ca. 3-6 ps für den langsamen Fluoreszenzzerfall.

Die sehr große Ähnlichkeit der Spektren der zweiten und der dritten Zeitkonstante stützen das in [112] vorgeschlagene Potentialschema und die darin enthaltenen Reaktionswege (Abb. 5.6). Da mit $\tau_2 \sim 450$ fs und $\tau_3 \sim 4$ ps zwei deutlich voneinander verschiedene Zeitkonstanten auftreten, müssen unter der Voraussetzung, daß in der PR-Probe keine unterschiedlichen Spezies mit unterschiedlichem spektralen und dynamischen Verhalten existieren, nach dem schnellen Verlassen des Franck-Condon Bereichs (S_1^{FC}) zwei verschiedene Zustände besetzt werden. Wegen der fast identischen Spektren der zweiten und der dritten Zeitkonstante könnte man nun schließen, daß einer der beiden Zustände (S_1^{relax}) ein spektroskopisch dunkler Zwischenzustand ist und die gesamte Emission aus dem Bereich der konischen Durchschneidung (S_1^{CI}) stammt. Die konische Durchschneidung S_1^{CI} würde somit entweder direkt mit der Zeitkonstante τ_1 oder indirekt mit der Zeitkonstante τ_3 über den Zwischenzustand (S_1^{relax}) besetzt werden. Von dort würde das Retinal dann entweder wieder zurück in

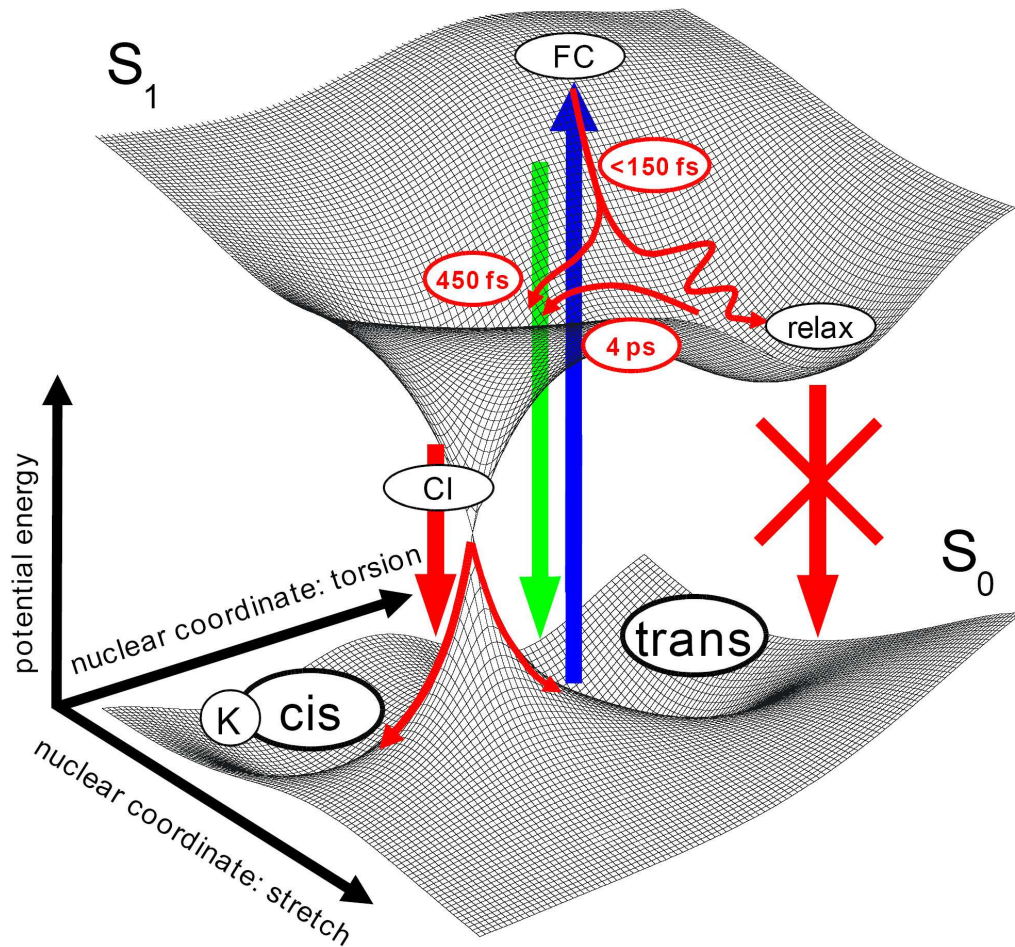


Abbildung 5.6: Energie- und Reaktionsschema der Primärreaktion von PR nach Photoanregung

den Grundzustand relaxieren oder isomerisieren und damit den Photozyklus einleiten (τ_2).

Findet das Verlassen des Franck-Condon Bereichs gegenüber dem Zerfall der anderen Zustände sehr schnell statt ($\tau_1 \ll \tau_2, \tau_3$), so liefert die Lösung des Raten-gleichungssystems für den Zerfall der Zustände S_1^{relax} und S_1^{CI} folgende zeitabhängige Besetzungen $B(t)$ (siehe z.B. [114]):

$$B^{\text{relax}}(t) = C_{\text{relax}} e^{-k_{\text{relax}} t},$$

$$B^{\text{CI}}(t) = C_{\text{relax}} \frac{k_{\text{relax}}}{k_{\text{CI}} - k_{\text{relax}}} e^{-k_{\text{relax}} t} + C_{\text{CI}} e^{-k_{\text{CI}} t}.$$

$k_{relax} = \frac{1}{\tau_3}$ und $k_{CI} = \frac{1}{\tau_2}$ sind die Ratenkonstanten für den Zerfall der jeweiligen Zustände. C_{relax} und C_{CI} sind Konstanten, die durch die initiale Besetzung der Zustände S_1^{relax} und S_1^{CI} gegeben sind.

Da sowohl die Ratenkonstanten $k_{relax} = 2.5 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$ und $k_{CI} = 2.2 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ als auch das Verhältnis der Amplituden der zugehörigen Zerfälle ($A_{relax} : A_{CI} = 3 : 10$) aus der Auswertung der experimentellen Daten bekannt sind, ist es möglich, die initiale Besetzung der Zustände zu berechnen. Nach kurzer Rechnung ergibt sich für die initialen Besetzungen ein Verhältnis von $B^{relax}(0) : B^{CI}(0) = 0.65 : 0.35$.

5.3 Zusammenfassende Bemerkung

In diesem Experiment wurden zum ersten Mal zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an Proteorhodopsin durchgeführt. Neben einem dynamischen Stokes-Shift wurden drei Zeitkonstanten von ~ 50 -150 fs, ~ 450 fs und ~ 4 ps gefunden. Es wird festgestellt, daß die Ergebnisse gut mit den Ergebnissen transienter Absorptionsexperimente übereinstimmen. Weiterhin ist festzuhalten, daß die bereits in den transienten Absorptionsexperimenten bestimmten Zeitkonstanten auf Grund der Analyse der zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten alle der Dynamik des elektronisch angeregten Zustands von PR zuzuordnen sind. Da zudem die zweite und dritte Zeitkonstante ähnliche Spektren und Amplituden aufweisen, wird das von Huber et al. [112] vorgeschlagene Energie- und Reaktionsschema gestützt.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Signalbeiträge bei Fluoreszenz und transienter Absorption	3
1.2	Potentialschema für elektronische Anregung	5
1.3	Zeitkonstanten in einem Ratengleichungsmodell	7
2.1	Prinzip eines optischen Schalters (a)	9
2.2	Prinzip eines optischen Schalters (b)	10
2.3	Prinzip der Up-Conversion	11
2.4	Prinzip des Kerr-Schalters	12
2.5	Aufbau des NOPA	14
2.6	Aufbau des OPA	15
2.7	Aufbau des Kerr-Schalter Systems	16
2.8	Schaltimpulsuntergrund verschiedener Kerr-Gläser	17
2.9	Emissionsuntergrund von Quarzglas	19
2.10	Weißlichtkontinuum	20
2.11	Statische Spektren von β -Carotin in Toluol	21
2.12	Zeitaufgelöste Spektren von β -Carotin in Toluol	22
2.13	Zeitverlauf der Fluoreszenz am Emissionsmaximum	23
3.1	trans \rightarrow cis Isomerisierung des Azobenzols	25
3.2	Azobenzol-Potentialschema	27
3.3	Statisches Absorptions- und Emissionsspektrum von trans-NA in Toluol	28
3.4	Ladungstrennung in NA nach Photoanregung	28
3.5	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von NA in Toluol	29
3.6	Amplitudenspektren von NA in Toluol	30
3.7	Reorganisationsenergie $\tilde{\lambda}$ bei optischen Übergängen	31
3.8	Reaktionsmodell von NA nach Photoanregung	32
4.1	Retinal mit protonierter Schiffischer Base	36
4.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von BR, Überblick	38
4.3	Höhenlinienbild der Fluoreszenzspektren von BR	39
4.4	Dynamischer Stokes-Shift der Fluoreszenzspektren von BR	40
4.5	Reaktionsmodelle der Primärreaktion von BR nach Photoanregung	42
4.6	Zeitverläufe der Fluoreszenz von BR bei verschiedenen Anregungs- dichten	43
5.1	Phylogenetischer Stammbaum rhodopsinartiger Gene	48

Abbildungsverzeichnis

5.2	Energie- und Reaktionsschema nach Huber et al.	49
5.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von PR, Überblick	50
5.4	Höhenlinienbild der Fluoreszenzspektren von PR	51
5.5	Dynamischer Stokes-Shift der Fluoreszenzspektren von PR	52
5.6	Energie- und Reaktionsschema der Primärreaktion von PR nach Photoanregung	53

Literaturverzeichnis

- [1] S.L. Shapiro, editor. *Ultrashort Light Pulses*. Springer, Berlin, 1977. 1, 2, 3
- [2] I.B. Berlman. *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*. Academic Press, New York and London, 1971. 1
- [3] C. Wheatstone. Some experiments to measure the velocity of electricity and the duration of electric light. *Phil. Trans.*, pages 583–591, 1834. 1
- [4] E. Becquerel. Recherches sur Divers Effets Lumineux qui Resultent de l'Action de la Lumiere sur le Corps. *Ann. Chim. Phys.*, 55:5–128, 1859. 1
- [5] E. Becquerel. Recherches sur Divers Effets Lumineux qui Resultent de l'Action de la Lumiere sur le Corps; Composition de la Lumiere Emise. *Ann. Chim. Phys.*, 57:40–124, 1859. 1
- [6] E. Becquerel. Recherches sur Divers Effets Lumineux qui Resultent de l'Action de la Lumiere sur le Corps. *Ann. Chim. Phys.*, 62:5–100, 1861. 1
- [7] A. Töpler. Vibroskopische Beobachtungen über die Schwingungsphasen singender Flammen (der chemischen Harmonica) mit Benutzung des Schlierenapparates. *Ann. Physik und Chemie*, 128:126–139, 1866. 1
- [8] A. Töpler. Optische Studien nach der Methode der Schlierenbeobachtung. *Ann. Physik und Chemie*, 131:33–55, 180–215, 1867. 1
- [9] H. Abraham and J. Lemoine. Disparition instantanee du phenomene de Kerr. *Compt. Rend.*, 129:206–211, 1899. 1
- [10] H. Abraham and J. Lemoine. Nouvelle Methode de Mesure des Durees Infinitesimales. Analyse de la Disparition des Phenomenes Electro-Optiques. *Ann. Chim. Phys.*, 20:264–287, 1900. 1
- [11] E.P. Ippen and C.V. Shank. Picosecond response of a high repetition rate CS₂ optical Kerr gate. *Appl. Phys. Lett.*, 26:92–93, 1975. 1
- [12] N. Bloembergen. From nanosecond to femtosecond science. *Rev. Mod. Phys.*, 71:S283–S287, 1999. 2
- [13] G. Porter. Flash photolysis and spectroscopy. A new method for the study of free-radical reactions. *Proc. Roy. Soc. (London)*, A200:284–300, 1950. 2

- [14] C.V. Shank and E.P. Ippen. Subpicosecond kilowatt pulses from a mode-locked cw dye laser. *Appl. Phys. Lett.*, 24:373–375, 1974. 2
- [15] D.E. Spence, P.N. Kean, and W. Sibbett. 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser. *Opt. Lett.*, 16:42–44, 1991. 2
- [16] T. Wilhelm, J. Piel, and E. Riedle. Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter. *Optics Letters*, 22(19):1494–1496, 1997. T261. 2, 14
- [17] G. Cerullo, M. Nisoli, and S. De Silvestri. Generation of 11 fs Pulses tunable across the Visible by Optical Parametric Amplification. *Appl. Phys. Lett.*, 71(25):3616–3618, 1997. 2
- [18] R. Huber, H. Satzger, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF₂. *Opt. Commun.*, 194:443–448, 2001. 2
- [19] S. Lochbrunner, T. Wilhelm, J. Piel, P. Huppmann, S. Spörlein, and E. Riedle. Tunable visible and NIR parametric amplifiers at 1 kHz and pulse lengths down to 10 fs. *Ultrafast Phenomena XI, Springer Series in Chem. Physics*, pages 57 – 59, 1998. 2
- [20] P. Baum, S. Lochbrunner, and E. Riedle. Tunable sub-10-fs ultraviolet pulses generated by achromatic frequency doubling. *Opt. Lett.*, 29:1686–1688, 2004. 2
- [21] B. Schrader and W. Meier, editors. *Raman/IR Atlas of Organic Compounds*. Verlag Chemie, Weinheim, 1975. 2
- [22] N. Sugimoto, S. Ito, S. Fujiwara, T. Suzuki, H. Kanbara, and K. Hirao. Femtosecond and terahertz optical Kerr shutter switching in glass containing high concentration of bi₂O₃. *Opt. Comm.*, 161:47–50, 1999. 4, 17
- [23] S. Kinoshita, H. Ozawa, Y. Kanematsu, I. Tanaka, N. Sugimoto, and S. Fujiwara. Efficient Optical Kerr Shutter for Femtosecond Time-resolved Luminescence Spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 71:3317–3322, 2000. 4, 11, 13
- [24] Y. Kanematsu, H. Ozawa, I. Tanaka, and S. Kinoshita. Femtosecond Optical Kerr-Gate Measurement of Fluorescence Spectra of Dye Solutions. *J. Lumin.*, 87-89:917–919, 2000. 4, 11, 13
- [25] J. Takeda, K. Nakajima, S. Kurita, S. Tomimoto, S. Saito, and T. Suemoto. Time-resolved Luminescence Spectroscopy by the Optical Kerr-Gate Method Applicable to Ultrafast Relaxation Processes. *Phys. Rev. B*, 62(15):10083–10087, 2000. 4, 11, 12, 13, 21

- [26] R. Nakamura and Y. Kanematsu. A simple and effective method for femtosecond spectral snapshots. *J. Lumin.*, 94-95:559–563, 2001. 4, 13
- [27] S. Arzhantsev and M. Maroncelli. Design and characterisation of a femtosecond fluorescence spectrometer based on optical Kerr gating. *Appl. Spectrosc.*, in press, 2004. 4, 11
- [28] H. Haken and H.C. Wolf, editors. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992. 6, 28
- [29] J. Kopecky, editor. *Photochemistry. A visual Approach*. VCH, New York, Weinheim, Cambridge, 1992. 6, 28
- [30] M. L. Horng, J. A. Gardecki, A. Papazyan, and M. Maroncelli. Subpicosecond Measurements of Polar Solvation Dynamics: Coumarin 153 Revisited. *J. Phys. Chem.*, 99:17311–17337, 1995. 6
- [31] M. Glasbeek and H. Zhang. Femtosecond Studies of Solvation and Intramolecular Configurational Dynamics of Fluorophores in Liquid Solution. *Chem. Rev.*, 104:1929–1954, 2004. 6, 11
- [32] D. Abramavicius, V. Gulbinas, L. Valkunas, Y.-J. Shiu, K. Liang, M. Hayashi, and S. Lin. Molecular Twisting and Relaxation in the Excited State of Triarylpnyrylium Cations. *J. Phys. Chem. A*, 106:8864–8869, 2002. 6, 7
- [33] Y.-C. Lu, C.W. Chang, and E. W.-G. Diau. Femtosecond fluorescence dynamics of *trans*-azobenzene in hexane on excitation to the $S_1(n, \pi^*)$ state. *J. Chin. Chem. Soc. Taip.*, 49:693–701, 2002. 6, 25
- [34] S.A. Kovalenko, R. Schanz, V.M. Farztdinov, H. Hennig, and N.P. Ernsting. Femtosecond Relaxation of Photoexcited Para-Nitroaniline: Solvation, Charge Transfer, Internal Conversion and Cooling. *Chem. Phys. Lett.*, 323:312–322, 2000. 6
- [35] D. Markovitsi, H. Sigal, C. Ecoffet, P. Millie, F. Charra, C. Fiorini, J.-M. Nunzi, H. Strzelecka, M. Veber, and C. Jallabert. Charge transfer in triaryl pyrylium cations. Theoretical and experimental study. *Chem. Phys.*, 182:69–80, 1994. 6
- [36] J. Hofrichter, E.R. Henry, J.H. Sommer, R. Deutsch, M. Ikeda-Saito, T. Yonetani, and W.A. Eaton. Nanosecond Optical Spectra of Iron-Cobalt Hybrid Hemoglobins: Geminate Recombination Conformational Changes, and Inter-subunit Communication. *Biochemistry*, 24:2667–2679, 1985. 7
- [37] S.J. Hug, J.W. Lewis, C.M. Einterz, T.E. Thorgeirsson, and D.S. Kliger. Nanosecond photolysis of rhodopsin: Evidence for a new, blue-shifted intermediate. *Biochemistry*, 29:1475–1485, 1990. 7

- [38] N.P. Ernsting, S.A. Kovalenko, T. Senyushkina, J. Saam, and V. Farztdinov. Wave-Packet-Assisted Decomposition of Femtosecond Transient Ultraviolet-Visible Absorption Spectra: Application to Excited-State Intramolecular Proton Transfer in Solution. *J. Phys. Chem. A*, 105:3443–3453, 2001. 7
- [39] C. Rullière, editor. *Femtosecond Laser Pulses*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998. 9
- [40] Q. An, W. Zinth, and P. Gilch. In Situ Determination of Fluorescence Lifetimes via Inverse Raman Scattering. *Opt. Comm.*, 202:209–216, 2002. 10
- [41] D. von der Linde and H. Schueler. Breakdown threshold and Plasma Formation in Femtosecond Laser-Solid Interaction. *J. Opt. Soc. Am. B.*, 13:216–222, 1996. 10
- [42] U. Teubner, U. Wagner, and E. Foerster. Sub 10-fs Gating of Optical Pulses. *J. Phys. B.*, 34:2993–3002, 2001. 10
- [43] Y.R. Shen, editor. *The Principles of Nonlinear Optics*. Wiley, New York, 1984. 10
- [44] R. Schanz, S.A. Kovalenko, V. Kharlanov, and N.P. Ernsting. Broad-band fluorescence up-conversion for femtosecond spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 79:566–568, 2001. 10, 11, 23
- [45] M.A. Duguay. The ultrafast optical Kerr shutter. *Prog. Opt.*, 14:161–193, 1976. 11, 13
- [46] W. Zinth and H. J. Körner, editors. *Physik 3 Optik , Quantenphänomene und Aufbau der Atome*. Oldenbourg, München Wien, 1998. 11, 12
- [47] J. Herrmann and B. Wilhelmi. *Laser für ultrakurze Lichtimpulse*. Physik-Verlag, Weinheim, 1984. 12, 21
- [48] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, and P. Gilch. A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy. *Appl. Phys. B*, 76:809–814, 2003. 13, 15, 20
- [49] R.A. Kaindl, M. Wurm, K. Reimann, P. Hamm, A.M. Weiner, and M. Wornner. Generation, shaping, and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20 μm . *J. Opt. Soc. Am. B*, 17:2086–2090, 2000. 14
- [50] P. Hamm, R.A. Kaindl, and J. Stenger. Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources. *Opt. Lett.*, 25:1798–1800, 2000. 14
- [51] J.E. Aber, M.C. Newstein, and B.A. Garetz. Femtosecond optical kerr effect measurements in silicate glasses. *J. Opt. Soc. Am. B*, 17:120–127, 2000. 17

-
- [52] D.R. Lide and H.P.R. Frederikse, editors. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 76th edition. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 1996. 19
- [53] A.N. Macpherson and T. Gillbro. Solvent Dependence of the Ultrafast $s_2 - -s_1$ Internal Conversion Rate of β - carotene. *J. Phys. Chem. A*, 102:5049–5058, 1998. 21, 22
- [54] M. Mimuro, S. Akimoto, S. Takaichi, and I. Yamazaki. Effect of molecular structures and solvents on the excited state dynamics of the s_2 state of carotenoids analyzed by the femtosecond up-conversion method. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:1452–1453, 1997. 21
- [55] H. Kandori, H. Sasabe, and M. Mimuro. Direct determination of a lifetime of the s_2 state of .beta.-carotene by femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2671–2672, 1994. 21
- [56] H. Zollinger. *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987. 25
- [57] H. Park, E.-R. Kim, D.J. Kim, and H. Lee. Synthesis of Metal-Azo Dyes and Their Optical and Thermal Properties as Recording Materials for DVD-R. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 75:2067–2070, 2002. 25
- [58] S. Spörlein, H. Carstens, H. Satzger, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation. *P. Natl. Acad. Sci USA* 99, 99:7998–8002, 2002. 25
- [59] J. Wachtveitl, S. Spörlein, H. Satzger, B. Fonrobert, C. Renner, R. Behrendt, D. Oesterheldt, L. Moroder, and W. Zinth. Ultrafast Conformational Dynamics in Cyclic Azobenzene Peptides of Increased Flexibility. *Biophys. J.*, 86:2350–2362, 2004. 25
- [60] H. Satzger, C. Root, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl, and W. Zinth. Picosecond Dynamics in Water Soluble Azobenzene-Peptides. *Chem. Phys. Lett.*, 2004. 25
- [61] I.K. Lednev, T.Q. Ye, R.E. Hester, and J.N. Moore. Femtosecond time-resolved uv-visible absorption spectroscopy of trans-azobenzene in solution. *J. Phys. Chem.*, 100:13338–13341, 1996. 25
- [62] T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Femtosecond photoisomerization of *cis*-azobenzene. *Chem. Phys. Lett.*, 272:489–496, 1997. 25, 26

- [63] H. Satzger, S. Spörlein, C. Root, J. Wachtveitl, W. Zinth, and P. Gilch. Fluorescence spectra of trans- and cis-azobenzene — emission from the franck-condon state. *Chem. Phys. Lett.*, 372:216–223, 2003. 25, 26
- [64] H. Satzger, C. Root, and M. Braun. Excited-State Dynamics of trans- and cis-Azobenzene after UV Excitation in the pi-pi* Band. *J. Phys. Chem. A*, 108:6265–6271, 2004. 25, 26
- [65] T. Fujino, S.Yu. Arzhantsev, and T. Tahara. Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Study of Photoisomerization of *trans*-azobenzene. *J. Phys. Chem. A*, 8123-8129:8123–8129, 2001. 25
- [66] T. Schultz, J. Quenneville, B. Levine, A. Toniolo, T. J. Martinez, S. Lochbrunner, M. Schmitt, J. P. Shaffer, M. Z. Zgierski, and A. Stolow. Mechanism and Dynamics of Azobenzene Photoisomerization. *J. Am. Chem. Soc.*, 125:8098–8099, 2003. 26
- [67] S. Monti, G. Orlandi, and P. Palmieri. Features of the photochemically active state surfaces of azobenzene. *Chem. Phys.*, 71:87–99, 1982. 26
- [68] C. Ciminelli, G. Granucci, and M. Persico. The Photoisomerization Mechanism of Azobenzene: A Semiclassical Simulation of Nonadiabatic Dynamics. *Chem. Eur. J.*, 10:2327–2341, 2004. 26, 27
- [69] E. W.-G. Diau. A New Trans-to-Cis Photoisomerization Mechanism of Azobenzene on the S1(n,*) Surface. *J. Phys. Chem. A*, 108:950–956, 2004. 26
- [70] N. Biswas and S. Umaphathy. Study of solvent effects on the molecular structure and the reorganization energies of 4 – nitro – 4' – dimethylaminoazobenzene using resonance raman intensities. *J. Raman Spectrosc.*, 32:471–480, 2001. 26, 31, 32
- [71] N. Biswas and S. Umaphathy. Resonance raman study of the solvent dynamics for ultrafast charge transfer transition in 4 – nitro – 4' – dimthyl – azobenzene. *J. Chem. Phys.*, 118:5526–5536, 2003. 26, 32
- [72] K. Gille, H. Knoll, and K. Quitzsch. Rate Constants of the Thermal Cis-Trans Isomerization of Azobenzene Dyes in Solvents, Acetone/Water Mixtures, and in Microheterogeneous Surfactant Solutions. *Int. J. Chem. Kinet.*, 31:337–350, 1999. 26
- [73] U. Haupts, J. Tittor, and D. Oesterhelt. CLOSING IN ON BACTERIORHODOPSIN: Progress in Understanding the Molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28:367–399, 1999. 35

- [74] K.A. Freedman and R.S. Becker. Comparative Investigation of the Photoisomerization of the Protonated and Unprotonated n-Butylamine Schiff Bases of 9-cis-, 11-cis-, 13-cis-, and all-trans-Retinals. *J. Am. Chem. Soc.*, 108:1245–1251, 1986. 35
- [75] H.-J. Pollard, M.A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, and D. Oesterhelt. Early Picosecond Events in the Photocycle of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 49:651–662, 1986. 35, 36
- [76] J. Tittor and D. Oesterhelt. The quantum yield of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 263:269–273, 1990. 35
- [77] M. Rohr, W. Gärtner, G. Schweitzer, A. Holzwarth, and S. Braslavsky. Quantum Yields of the Photochromic Equilibrium between Bacteriorhodopsin and Its Bathointermediate K. Femto- and Nanosecond Optoacoustic Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 96:6055–6061, 1992. 35
- [78] S. Logunov, M. El-Sayed, L. Song, and J. Lanyi. Photoisomerization Quantum Yield and Apparent Energy Content of the K Intermediate in the Photocycles of Bacteriorhodopsin, Its Mutants D85N, R82Q, and D212N, and Deionized Blue Bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem.*, 100:2391–2398, 1996. 35, 36
- [79] M.A. El-Sayed and S. Logunov. On the molecular origin of the protein catalysis of the primary process in bacteriorhodopsin photosynthesis: Retinal photoisomerization. *Pure Appl. Chem.*, 69:749–754, 1997. 35, 36
- [80] M.C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, and D. Oesterhelt. Femtosecond Spectroscopy of the First Events of the Photochemical Cycle in Bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 117:1–7, 1985. 36
- [81] A. Sharkov, A. Pakulev, and Y. Matveetz. Primary Events in Bacteriorhodopsin Probed by Subpicosecond Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 808:94–102, 1985. 36
- [82] J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt. Excited-State Reaction Dynamics of Bacteriorhodopsin Studied by Femtosecond Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 144:215–220, 1988. 36, 40, 41, 42, 48
- [83] R. Mathies, C. Cruz, W. Pollard, and C. Shank. Direct Observation of the Femtosecond Excited-State Cis-Trans Isomerisation in Bacteriorhodopsin. *Science*, 240:777–779, 1988. 36, 40, 41, 42, 48
- [84] G. Haran, K. Wynne, A. Xie, Q. He, M. Chance, and R. M. Hochstrasser. Excited state dynamics of bacteriorhodopsin revealed by transient stimulated emission spectra. *Chem. Phys. Lett.*, 261:389–395, 1996. 36

- [85] K.C. Hasson, F. Gai, and P.A. Anfinrud. The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three-state model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:15124–15129, 1996. 36, 40, 41, 42
- [86] T. Ye, N. Friedman, Y. Gat, G. Atkinson, M. Sheves, M. Ottolenghi, and S. Ruhman. On the Nature of the Primary Light-Induced Events in Bacteriorhodopsin: Ultrafast Spectroscopy of Native and $c_{13} = c_{14}$ Locked Pigments. *J. Phys. Chem. B*, 103:5122–5130, 1999. 36, 40, 41
- [87] B. Hou, N. Friedman, S. Ruhman, M. Sheves, and M. Ottolenghi. Ultrafast Spectroscopy of the Protonated Schiff Bases of Free and C13=C14 Locked Retinals. *J. Phys. Chem. B*, 105:7042–7048, 2001. 36
- [88] S.L. Dexheimer, Q. Wang, L.A. Peteanu, W.T. Pollard, R.A. Mathies, and C.V. Shank. Femtosecond impulsive excitation of nonstationary vibrational states in bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 188:61–66, 1992. 36
- [89] W. Zinth, A. Sieg, P. Huppmann, T. Blankenhorn, D. Oesterhelt, and M. Nonella. Femtosecond spectroscopy and model calculations for an understanding of the primary reaction in bacteriorhodopsin. *Ultrafast Phenomena XII, Springer Series in Chem. Physics 66*, pages 680 – 682, 2000. 36, 41, 42, 48
- [90] M. Du and G. Fleming. Femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy of bacteriorhodopsin: Direct observation of excited state dynamics in the primary step of the proton pump cycle. *Biophys. Chem.*, 48:101–111, 1993. 37, 40
- [91] S. Haacke, S. Schenkl, S. Vinzani, and M. Chergui. Femtosecond and Picosecond Fluorescence of Native Bacteriorhodopsin and a Nonisomerizing Analog. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 67:306–309, 2002. 37, 39, 40, 50
- [92] S. Haacke, S. Vinzani, S. Schenkl, and M. Chergui. Spectral and Kinetic Fluorescence Properties of Native and Nonisomerizing Retinal in Bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Chem.*, 2:310–315, 2001. 39, 50
- [93] T. Ye, B. Hou, E. Gershgoren, M Ottolenghi, N. Friedman, M. Sheves, and S. Ruhman. Resolving the primary dynamics of bacteriorhodopsin, and Locked analogs in the reactive excited state. *Ultrafast Phenomena XII, Springer Series in Chem. Physics 66*, pages 683–685, 2000. 40
- [94] M. Garavelli, F. Negri, and M Olivucci. Initial Excited-State Relaxation of the Isolated 11-cis Protonated Schiff Base of Retinal: Evidence for in-Plane Motion from ab Initio Quantum Chemical Simulation of the Resonance Raman Spectrum. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:1023–1029, 1999. 41, 42, 48

-
- [95] H. Abramczyk. Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin and its retinal modified analogs: Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Chem. Phys.*, 120:11120–11132, 2004. 41, 42, 48
- [96] R.R. Birge. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1016:293–327, 1990. 41
- [97] R. Gonzalez-Luque, M. Garavelli, F. Bernardi, M. Merchan, M.A. Robb, and M. Olivucci. Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:9379–9384, 2000. 41, 42, 48
- [98] F. Gai, K.C. Hasson, J.Cooper McDonald, and P. Anfinrud. Chemical Dynamics in Proteins: The Photoisomerization of Retinal in Bacteriorhodopsin. *Science*, 279:1886–1891, 1998. 41, 42
- [99] H. Polland, M. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt. Energy transfer from retinal to amino acids - a time-resolved study of the ultraviolet emission of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 851:407–415, 1986. 43
- [100] S.L. Logunov, V.V. Volkov, M. Braun, and M.A. El-Sayed. The relaxation dynamics of the excited electronic states of retinal in bacteriorhodopsin by two-pump-probe femtosecond studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:8475–8479, 2001. 43
- [101] O. Beja, L. Aravind, E.V. Koonin, M.T. Suzuki, A. Hadd, L.P. Nguyen, S.B. Jovanovich, C.M. Gates, R.A. Feldman, J.L. Spudich, E.N. Spudich, and E.F. DeLong. Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science*, 289:1902–1906, 2000. 47
- [102] O. Beja, E.N. Spudich, J.L. Spudich, M. Leclerc, and E.F. DeLong. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 411:786–789, 2001. 47
- [103] J.R. de la Torre, L.M. Christianson, O. Beja, M.T. Suzuki, D.M. Karl, J. Heidelberg, , and E.F. DeLong. Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:12830–12835, 2003. 47
- [104] G. Sabeji, R. Massana, J.P. Bielawski, M. Rosenberg, E.F. DeLong, and O. Beja. Novel proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas. *Environ. Microbiol.*, 5:842–849, 2003. 47
- [105] J.C. Venter, K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D.Y. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H.

- Knap, M.W. Lomas, K. Nealsen, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.H. Rogers, and H.O. Smith. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 302:66–74, 2004. 47, 48
- [106] R.A. Krebs, A.M. DeVita, R. Parthasarathy, U. Alexiev, D. Dunmire, and M.S. Braiman. Purification and spectroscopic studies of proteorhodopsin. *Biophys. J.*, 82:224A–224A, 2002. 47
- [107] A.K. Dioumaev, L.S. Brown, J. Shih, E.N. Spudich, J.L. Spudich, and J.K. Lanyi. Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. *Biochemistry*, 41:5348–5358, 2002. 47
- [108] T. Friedrich, S. Geibel, R. Kalmbach, I. Chizhov, K. Ataka, J. Heberle, M. Engelhard, and E. Bamberg. Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality. *J. Mol. Biol.*, 321:821–838, 2002. 47, 48, 49
- [109] G. Varo, L.S. Brown, M. Lakatos, and J.K. Lanyi. Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. *Biophys. J.*, 84:1202–1207, 2003. 47
- [110] M. Lakatos, J.K. Lanyi, J. Szakacs, and G. Varo. The photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low pH. *Biophys. J.*, 84:3252–3256, 2003. 47
- [111] A.K. Dioumaev, J.M. Wang, Z. Balint, G. Varo, and J.K. Lanyi. Proton Transport by Proteorhodopsin Requires that the Retinal Schiff Base Counterion Asp-97 Be Anionic. *Biochemistry*, 42:6582–6587, 2003. 47
- [112] R. Huber, T. Köhler, M.O. Lenz, E. Bamberg, R. Kalmbach, M. Engelhard, and J. Wachtveitl. pH dependent Photoisomerization of Retinal in Proteorhodopsin. *Biochemistry*, submitted, 2004. 48, 49, 52, 54
- [113] T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts, and D. Oesterhelt. The initial reaction dynamics of the light-driven chloride pump halorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 241:559–565, 1995. 49
- [114] H.G. Zachmann. *Mathematik für Chemiker*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990. 53

Lebenslauf

Name	Bernhard Schmidt
02.11.1974	Geboren in Blasendorf, Rumänien
1981 - 1985	Grundschule Traunreut
1985 - 1994	Gymnasium Traunreut
1994 - 1995	Zivildienst im Wilhelm-Löhe-Heim Traunreut des Diakonischen Werks
1995 - 2001	Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2001	Diplom der Physik, Titel der Diplomarbeit: 'Femtosekundenfluoreszenzspektroskopie mit Hilfe des Kerr-Effekts - Entwicklung und Charakterisierung'
2001 - 2004	wissenschaftlicher Mitarbeiter der Ludwig-Maximilians-Universität München

Danksagung

Es haben viele Leute zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihnen allen möchte ich dafür herzlich danken, vor allem auch denen, die hier nicht namentlich genannt sind. Im Folgenden möchte ich gerne einigen wenigen Personen besonders danken:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Lehrstuhl erstellen zu dürfen, für die Unterstützung dieser Arbeit und die vielen guten Tips.

Meinem Betreuer Dr. Peter Gilch für seine beständige Unterstützung, aufopferungsvolle Hilfsbereitschaft und große Geduld bei allen Fragen und Problemen. Ohne ihn hätte diese Arbeit nie den jetzigen Stand erreichen können.

Stefan Laimgruber, der maßgeblich am Aufbau und Erfolg der Experimente beteiligt war.

Dr. Qingrui Nilsson und Björn Heinz für die gute Zusammenarbeit im Labor und die Hilfe bei vielen Dingen.

Dr. Ingmar Hartl für die vielen Tips und Tricks, auch nachdem er den Lehrstuhl bereits verlassen hatte.

Constanze Sobotta für die gute Zusammenarbeit, vor allem bei den Messungen an NA und BR.

Birgit Bußmann, Rossana Reho, Dr. Kai Stock und Arne Sieg, die nicht nur Studien- und Arbeitskollegen waren, sondern auch zu Freunden geworden sind.

Allen übrigen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zinth während meiner Zeit an diesem Lehrstuhl: Dr. Erik Baigar, Dr. Markus Braun, Regina Dürr, Dr. Benno Fonrobert, Isabel Gruber, Dr. Robert Huber, Florian Koller, Vladimir Konjaev, Dr. Ingo Lutz, Stephan Malkmus, Dr. Karl-Heinz Mantel, Jörg Neuhaus, Andre Peine, Dr. Horst Pulvermacher, Christopher Root, Dr. Helmut Satzger, Tobias Schrader, Wolfgang Schreier und Dr. Sebastian Spörlein für die gute Zusammenarbeit am Lehrstuhl und die vielen nützlichen Tips.

Prof. Dr. Josef Wachtveitl und seinen Mitarbeitern Martin Lenz und Thomas Köhler für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der PR-Proben.

Jörg Tittor für die gute Zusammenarbeit und die die Bereitstellung der BR-Proben.

Prof. Dr. Riedle und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Tavan und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und das 'Asyl', welches mir während meines ersten Jahres am Lehrstuhl

Danksagung

gewährt wurde.

Rudi Schwarz, Alfons Stork und Christian Hausmann aus der Werkstatt für die freundliche und stets prompte Erledigung aller Arbeiten.

Jörg Krebs und Harald Hoppe für die Unterstützung bei chemischen bzw. optischen Arbeiten.

Den ehemaligen und aktuellen Mitarbeiterinnen des Sekretariats: Barbara Podolski, Nicole Klemradt und Alexandra Michaelis für die große Hilfsbereitschaft auch über das notwendige Maß hinaus.

Vor allem danken möchte ich meinen Eltern und meiner Freundin Bettina für die immerwährende Unterstützung in allen Dingen, ohne die ich es nie bis hierher geschafft hätte.

Anhang

Im Folgenden finden sich Nachdrucke von Originalarbeiten, in denen sich die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse weitestgehend wiederfinden.

B. SCHMIDT
S. LAIMGRUBER
W. ZINTH
P. GILCH[✉]

A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy

Sektion Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, Oettingenstr. 67, 80538 München, Germany

Received: 11 April 2003/Revised version: 20 May 2003

Published online: 9 July 2003 • © Springer-Verlag 2003

ABSTRACT An improved Kerr-based set-up for time-resolved emission spectroscopy in the femtosecond regime is presented. The Kerr gate is switched by femtosecond NIR pulses of ~ 1100 nm. Thereby, practically no background emission of the Kerr medium is observed for wavelengths smaller than 1000 nm. This allows for the simultaneous acquisition of emission spectra in the spectral range from 350 nm to 1000 nm. By employing mainly reflective optics, the dispersion of the gate set-up could be kept below 0.2 ps (500–800 nm). The time resolution of the set-up was ~ 100 fs. Its performance is demonstrated by recording the spectro-temporal behaviour of a white-light continuum and of the fluorescence emissions of β -carotene and an azobenzene derivative.

PACS 32.50.+d; 42.65.Re

1 Introduction

Transient absorption techniques in the femtosecond regime rely more and more on broadband detection schemes (see for example [1, 2]). The absorption changes of a sample induced by an ultrashort laser pulse can be interrogated by a suitably delayed continuum pulse which is spectrally dispersed and detected after passing the sample. Thereby, complete transient absorption spectra at a given delay time can be obtained, which in turn dramatically reduces the acquisition times. Femtosecond fluorescence spectroscopy is an important complement to absorption techniques. While the latter senses signals from ground and electronically excited states, the former exclusively detects excited states and their dynamics. This simplifies the assignment of photo-induced spectral changes to the underlying processes.

The standard experimental approach to femtosecond fluorescence spectroscopy is fluorescence up-conversion [3]. In its traditional implementation it yields fluorescence decay traces at defined detection wavelengths and not complete spectra. This restriction is founded in the mechanism of fluorescence up-conversion. The fluorescence light of interest is

mixed in a non-linear crystal with a femtosecond laser pulse (gate pulse), where the sum frequency of both light fields is generated. This process requires a phase matching condition which depends on the light frequency and the crystal orientation. In general, only narrow spectral slices of the fluorescence emission are up-converted simultaneously. The acquisition of complete spectra then requires multiple delay scans and re-alignment of the up-conversion crystal. Recently, this restriction of the up-conversion technique has been softened considerably [4]. The combination of a thin low-dispersion crystal and a near-infrared gate pulse greatly enhances the up-conversion bandwidth. In this fashion, the simultaneous acquisition of time-resolved fluorescence spectra with a width of ~ 7000 cm^{-1} has been demonstrated.

An alternative technique for fluorescence spectroscopy in the femtosecond regime relies on the optical Kerr effect. This effect has been employed as an optical gate from the early days of mode-locked lasers [5]. Its usage for fluorescence spectroscopy has seen a renaissance in recent years [6, 7]. In a Kerr set-up, the fluorescence light passes two crossed polarisers between which an isotropic Kerr medium (usually a glass plate) is placed. In the closed state of the set-up, no fluorescence light is transmitted. The shutter is opened by a gate pulse focused onto the medium, where it induces optical anisotropy. This anisotropy changes the polarisation state of the fluorescence light from linear to elliptical. A fraction of this light is now transmitted by the second polariser and can be detected. In this gate scheme, no phase-matching condition has to be fulfilled. Therefore, in principle the spectral window that can be recorded simultaneously should only be limited by the transmittance of the optical components and the sensitivity range of the detector. In the practical application, several effects reduce the open spectral window: (i) Gate light scattered by the Kerr medium is several orders of magnitude more intense than the fluorescence signal, and has to be suppressed by suitable filters, thereby blocking that spectral region; (ii) Multi-photon absorption of the gate pulse in the Kerr medium can cause a strong background emission [7]. This emission may reduce the sensitivity in the spectral area where it overlaps with the fluorescence emission. However, for a weak fluorescence emission, it may also prohibit measurements; and (iii) The dispersion of the optical components influences the arrival times of different spectral components of the fluorescence light – blue parts of the spectrum are de-

✉ Fax: +49-89/2180-9202,
E-mail: Peter.Gilch@physik.uni-muenchen.de

layed with respect to red parts. This dispersion of arrival times has to be taken into account when choosing the delay settings and, therefore, increases the acquisition time.

Here, a novel design for a Kerr shutter is presented that relaxes most of these constraints and offers an open detection window ranging from 350 nm to 1000 nm. The design uses a gate pulse that is centred in the NIR at ~ 1100 nm, which strongly reduces emission of the Kerr medium. The optics which image the fluorescence light onto the Kerr medium and the broadband wire-grid polarisers have very little dispersion, in order to minimise spectral delay of the arrival times.

2 Experimental

Femtosecond laser pulses were generated by a Clark CPA 2001 laser/amplifier system running at 775 nm. It supplied pulses with a duration of 150 fs (FWHM) and an energy of 0.9 mJ at a repetition rate of 1 kHz. A part of the output (210–220 μ J) of the CPA was used to pump a two-stage non-collinear optical parametric amplifier (NOPA) [8] which generated femtosecond laser pulses tunable throughout the visible and NIR. These pulses excited the sample. For the experiments described here, the NOPA was tuned to 475 nm. At the sample location, the pulse energy was attenuated to ~ 1 μ J. For the generation of NIR gate pulses, another part of the CPA output (250 μ J) was directed to a (collinear) optical parametric amplifier (OPA). The amplifier design borrowed from that described in ref. [9, 10]. This OPA was a two-stage amplifier. Each stage consisted of a type-II BBO crystal and was pumped by the laser fundamental. In the first stage (pump energy ~ 30 μ J), a 3 mm BBO crystal was seeded by a white-light continuum generated in a sapphire plate. Signal pulses were then amplified in a second 4 mm BBO crystal (pump energy ~ 200 μ J). The idler pulses were separated from the signal pulses by a polariser. The signal pulses were compressed in a SF10 prism compressor. The OPA was adjusted to deliver NIR pulses at 1100 nm with a duration of 40 fs. At the Kerr gate these pulses had energies of ~ 10 μ J.

Sample solutions of β -carotene (Aldrich) were prepared freshly by dissolving 20 mg in 50 ml toluene (Merck, UVA-SOL grade). 4-nitro-4'-dimethylaminoazobenzene was syn-

thesized according to ref. [11], purified by re-crystallisation and characterized by NMR. 33 mg of this sample was dissolved in 200 ml toluene. To avoid the signal contributions of the photo-products, the sample solutions were pumped rapidly through flow cells (fused-silica cuvette, optical path length of 1 mm).

3 Results and discussion

3.1 Description of the Kerr shutter

An efficient optical gate in the femtosecond regime should be able to collect a large solid angle of the (isotropic) fluorescence emission, thereby introducing as little dispersion as possible. This requires reflective optics. In the set-up described here (Fig. 1), two Cassegranian microscope objectives (Ealing, numerical aperture 0.5, focal length 13 mm) collect the fluorescence light and focus it onto the Kerr medium. A 1 mm thick fused silica plate (SUPRASIL 300 as supplied by Helma) serves as the Kerr medium. The fluorescence light is polarised by a wire-grid polariser (ProFluxTM PPL04C, substrate thickness 0.7 mm, extinction 1 : 1000) placed between the second Cassegranian and the Kerr medium. A second crossed polariser behind the Kerr medium extinguishes (in the absence of the gate light) the fluorescence light. The gate pulse that opens the shutter is reflected towards the Kerr medium by a tiny 45° mirror placed in the obscuration of the second Cassegranian. Its polarisation plane is rotated by 45° with respect to the transmission axis of the first polariser. The fluorescence light and the gate light propagate collinearly in the Kerr medium. This geometry reduces deterioration of the time resolution resulting from a non-collinear arrangement. The transmitted light is collected by an off-axis parabolic mirror. Its aperture was chosen to fit those of the Cassegranians. An achromatic lens then focuses the fluorescence light onto the entrance slit of a spectrograph. A dielectric mirror (HR 1060 nm, 45°) placed at an angle of 0° in front of the entrance slits rejects the light of the gate pulse. Long-pass filters (OG 515 from Schott for the fluorescence experiments, OG 495 for the white-light experiments) mounted at the same location remove the residual light of the pump pulse. The spectrograph (Acton Research, Spektra Pro 300i,

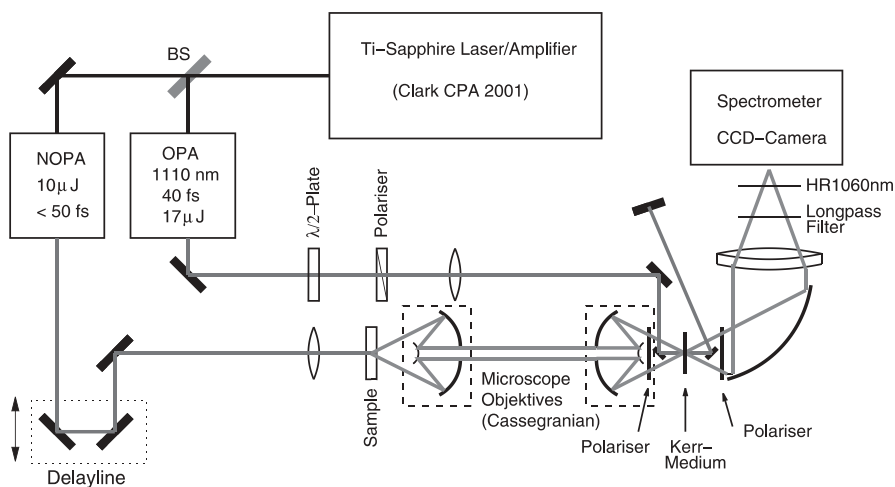


FIGURE 1 Scheme of the Kerr set-up

$f = 300$ mm, aperture 0.25) is equipped with a 150 lines/mm grating and images the dispersed fluorescence onto an liquid-nitrogen-cooled CCD-camera (Princeton Instruments, Spec-10 : 400B). The spectrograph/detector set-up covered a spectral range from 350 nm to 1000 nm.

3.2 Characterisation of the Kerr shutter

3.2.1 Background emission of the Kerr medium. In the femtosecond regime, only solid materials (mostly glasses) are suitable as Kerr media, because in liquids orientational contributions to the Kerr non-linearity deteriorate the time resolution (for a comparison of the Kerr response of the liquid CS₂ and a glass see for example [12]). Among glasses suitable for a Kerr application, those with a high Kerr non-linearity seem to be the best candidates. Unfortunately, glasses with a high non-linearity usually also show a large dispersion (see for example [13]). Such a dispersion reduces the time resolution due to large differences of the group velocities of the gate pulse and the gated fluorescence light. Therefore, a material – fused silica – with a rather low Kerr non-linearity was chosen for the set-up described here. Fused silica yielded the best time resolution among the materials tested (SrTiO₃, BK 7 glass, SF 5 glass). It offered the additional advantages that its bandgap is far in the UV and emission following multiphoton absorption is rather weak. This applies already for gate pulses centered around 800 nm (the fundamental of common titanium-sapphire systems) for which a weak unstructured emission is detected (data not shown). However, using laser fundamental pulses as gate pulses excludes the interesting spectral region around 800 nm from spectroscopic investigations (Fig. 2, grey area). NIR (1100 nm) pulses, as in the set-up described here, open this region for spectroscopic investigation (see Fig. 2). In addition, the broad background due to multi-photon fluorescence emission is now virtually missing. This applies not only to fused silica glasses such as Kerr media, for which this emission is generally weak, but also to other media like SF5 (data

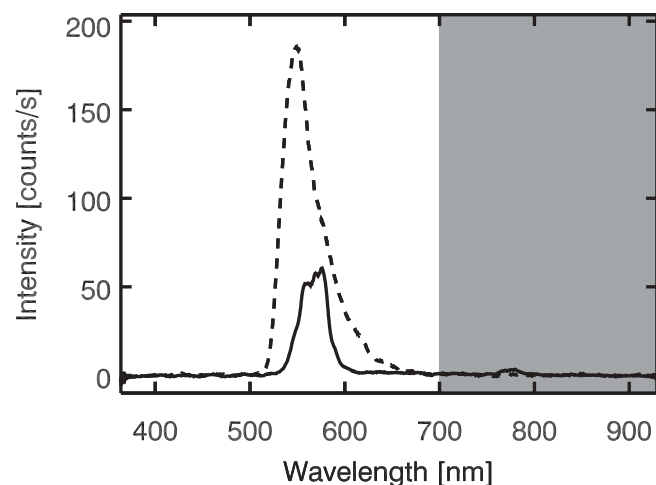


FIGURE 2 Background emission of the Kerr medium (*solid line*) when exciting with the 1100 nm gate pulses. The *grey area* symbolizes the spectral region blocked when employing 775 nm gate pulses. A time-resolved fluorescence spectrum of β -carotene (*dashed line*) at zero delay is depicted for comparison

not shown). The only background emission observed is a rather sharp peak centred at 550 nm. This peak presumably stems from second-harmonic generation at the surface of the Kerr glass. Its magnitude varies somewhat between different fused silica samples; the smallest emission was observed for a SUPRASIL 300 plate which was the Kerr medium used in the following. To illustrate the magnitude of the second harmonic background, the emission of this glass is compared with a time-resolved fluorescence spectrum in Fig. 2.

3.2.2 Temporal resolution and dispersion. The ideal light source for the characterisation of a time-resolved fluorescence spectrograph can be switched on and off instantaneously and its emission spectrum should cover the whole spectral range of the detector. A femtosecond white-light continuum generated when tightly focusing an ultrashort laser pulse into a transparent medium approaches that ideal. The duration of this continuum in a given spectral region may be shorter than the laser pulses generating it, and it is therefore well suited for the determination of the temporal resolution of a particular set-up. In the present experiment, the continuum was

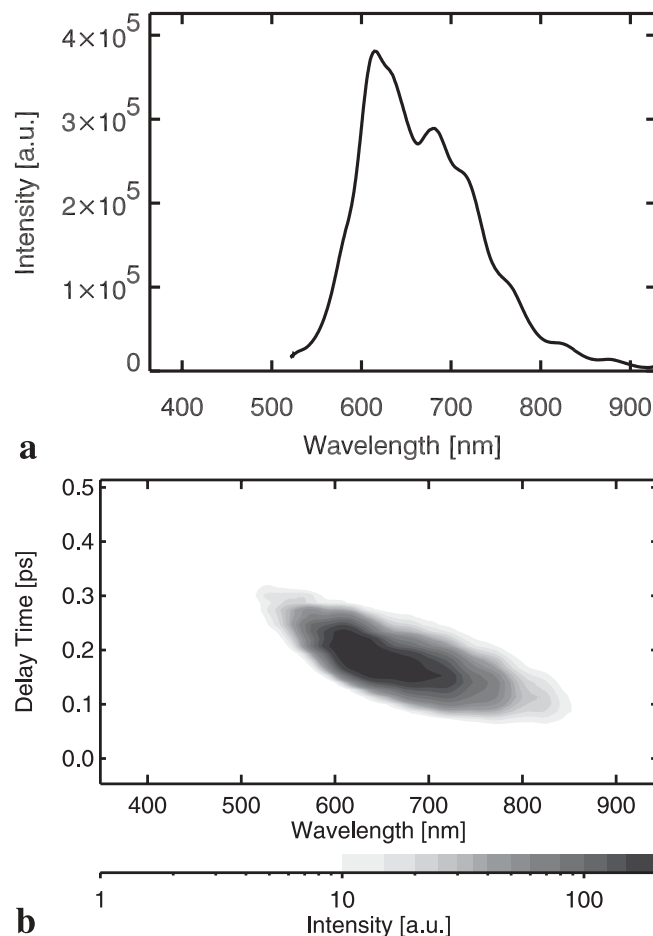


FIGURE 3 Spectral and temporal characteristics of a white-light continuum used to characterise the Kerr set-up. **a** Spectrum of the continuum generated by focussing 475 nm NOPA pulses into a 2 mm thick CaF₂ plate. The spectrum is corrected for the spectral sensitivity of the set-up. The cut-off of the spectrum beyond 520 nm is due to a long-pass filter. **b** Gated intensity versus delay time and wavelength as recorded with the Kerr set-up

produced by focusing the NOPA light (475 nm) into a rotating 2 mm thick CaF₂ plate placed at the sample location. The white-light spectrum was recorded using the Kerr set-up (Fig. 3a). The apparent time dependence of this continuum pulse obtained with the Kerr shutter is depicted in Fig. 3b. The contour plot shows the emission intensity versus wavelength and pump-gate delay. The banana shape of this emission is due to the group velocity dispersion of the Kerr shutter. To quantify this dispersion, the wavelength dependence of the maxima of the emission along the time axis was determined. Between 500 nm and 800 nm, the peak shift caused by the set-up amounted to only 0.2 ps. Three components in the Kerr shutter cause this delay: the CaF₂ plate (2 mm), the wire-grid polariser (0.7 mm of Corning 1737F industrial grade substrate) and the Kerr medium (1 mm of fused silica). In the calculation of this delay, it was assumed that the continuum was generated in the centre of the CaF₂ plate, i.e. the effective length is 1 mm, and that the whole length of Kerr medium contributed to the delay. This calculation yielded a value of 209 fs, in good agreement with the experimental result. The time-resolved fluorescence spectra presented in the following are corrected for this time zero dispersion. The correction procedure relies on the white-light data presented above and adds the contribution of the solvent. This contribution is calculated from dispersion data (the values for the solvent toluene used here were taken from [14]).

The white-light experiment not only yielded the arrival times of different wavelengths, but also a lower limit for the instrumental response function of the set-up. This time resolution was ~ 80 fs (FWHM).

3.3 Femtosecond fluorescence spectra

Before we turn to the acquisition of time-resolved fluorescence spectra, the procedures used to correct for the spectral sensitivity of the set-up will be described. There are two contributions to this sensitivity: the “cw sensitivity” and the wavelength dependence of the gate efficiency $g(\lambda)$. The “cw sensitivity” stems from the reflectivity and the transmission of the optical components and the quantum efficiency of the CCD detector. This sensitivity is easily determined and corrected for using a black-body radiator as a reference. The gate efficiency $g(\lambda)$ is expected to decrease with increasing wavelength, since for a given Kerr anisotropy the phase shift becomes smaller with increasing wavelength. This dependence was obtained experimentally by the following procedure: The cw fluorescence spectrum $S_{\text{cw}}(\lambda)$ was recorded and compared with the temporal integral of the time-resolved spectra $S(\lambda, t)$, i.e.

$$g(\lambda) = \frac{1}{\tau_{\text{cc}}} \frac{\int_0^{\infty} S(\lambda, t) dt}{S_{\text{cw}}(\lambda)}. \quad (1)$$

Here, τ_{cc} is the opening time of the shutter (taken as the FWHM of the instrumental response function). Assuming that the dispersion of the non-linear refractive index responsible for the Kerr effect can be neglected, the gate efficiency $g(\lambda)$ should be proportional to $\frac{1}{\lambda^2}$ [6], i.e. multiplication of the time-integrated spectrum with λ^2 should recover the cw spectrum. This is indeed the case as the spectra depicted

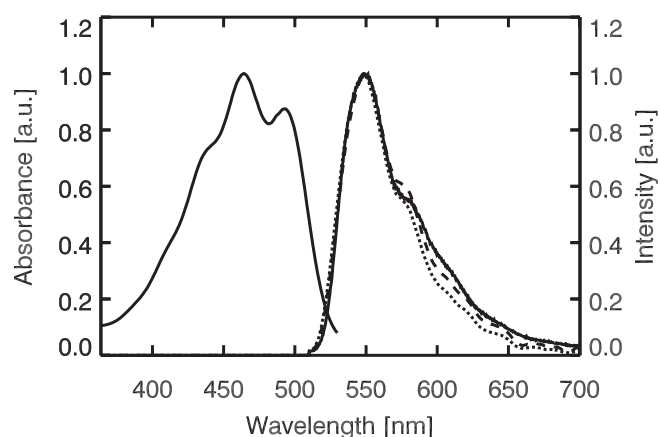


FIGURE 4 Steady-state spectra of β -carotene in toluene. The sample concentrations were 1.5×10^{-4} M and 7.5×10^{-4} M for the absorption and the emission spectra, respectively. The spectrum is corrected for the spectral sensitivity of the set-up. The cut-off of the spectrum beyond 510 nm is due to a long-pass filter. The emission spectra were recorded with the Kerr set-up either with parallel polarisers (cw spectrum, *solid line*) or by numerically integrating the time-resolved fluorescence signal. These spectra are depicted with (*dashed line*) and without (*dotted line*) λ^2 correction (see text)

in Fig. 4 demonstrate. Therefore, in the following, all time-resolved spectra are presented with a λ^2 correction factor.

The dynamics of two fluorophores were studied to demonstrate the performance of this Kerr shutter under real experimental conditions. The first one, β -carotene, has a very large optical transition moment (the extinction coefficient in cyclohexane is $\epsilon = 134\,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [15]) and was therefore expected to exhibit a strong transient fluorescence signal. The time-resolved emission of this compound has already been subject to numerous studies [15–17] and therefore allows the checking of the consistency of the results. The other one, 4-nitro-4'-dimethylaminoazobenzene is a weaker emitter (with an extinction coefficient of $\epsilon = 17\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in benzene). To our knowledge, its time-resolved emission has never been reported. Because of its photo-inducible trans-cis-isomerisation, many time-resolved experiments on the parent part of the molecule, the azobenzene, have been reported (e.g. [18, 19]).

β -carotene in toluene was excited with a NOPA (1 μJ), centred at 475 nm, close to the maximum of its absorption spectrum (see Fig. 4). Time-resolved fluorescence spectra (Fig. 5) were recorded with a gate pulse energy of 10 μJ , and the exposure time for each delay time was set to 3 s. With this setting, the acquisition of the complete fluorescence dynamics depicted in Fig. 5 could be recorded in only 3 min, with a good signal-to-noise ratio. The time-resolved spectra peak at 545 nm. Apart from a modest broadening, the shape of the fluorescence emission does not change during the decay. This behaviour is in excellent agreement with the results of Macpherson and Gillbro [15], who report a maximum of 542 nm and a shape invariance. The time dependence of the fluorescence emission close to the maximum at 545 nm is compared with a model function in Fig. 5b. The trial function is the sum of two decaying exponentials convoluted with a Gaussian to model the instrumental response function, and describes the data very well. The best fit parameters were 135 fs for the response function (FWHM) and 103 fs for the

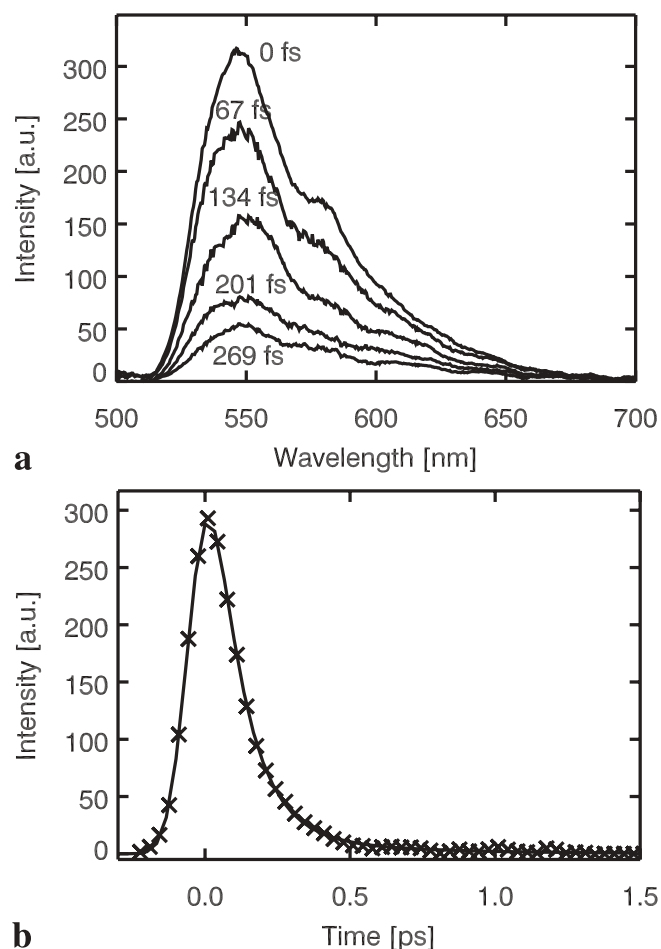


FIGURE 5 Time-resolved fluorescence spectra of β -carotene in toluene. The data are corrected for the dispersion of time zero, the spectral sensitivity and the gate efficiency. **a** Time-resolved spectra. **b** Time trace at the maximum of the fluorescence spectrum. The *line* describes the result of the fit as described in the text

decay time with the dominant amplitude. The second time constant was determined to be 415 fs and carried an amplitude of only 3% as compared to the 103 fs component. The value of 103 fs is close to the time constant of 144 fs determined by up-conversion measurements [15]. The slightly shorter time constant reported here can at least partially be ascribed to the bi-exponential fit function employed here as compared to the single exponential trial function of ref. [15]. The time resolution of 135 fs derived from the fit of the fluorescence decay does not reach the value of ~ 80 fs obtained by the white-light measurements. Presumably this is because the white-light emission originates from a smaller volume than the fluorescence emission and the optical path length differences are, therefore, somewhat larger for the fluorescence experiments. With this response time, an absolute value of the gate efficiency g as defined by (1) can be determined. At the spectral maximum of the β -carotene emission, this efficiency is 3–4%, which is comparable to the values reported by Takeda et al. [6].

The acquisition of femtosecond fluorescence spectra of the azobenzene derivative is more challenging since its oscillator strength is an order of magnitude smaller than that of β -carotene and its fluorescence decay is bi-phasic, with

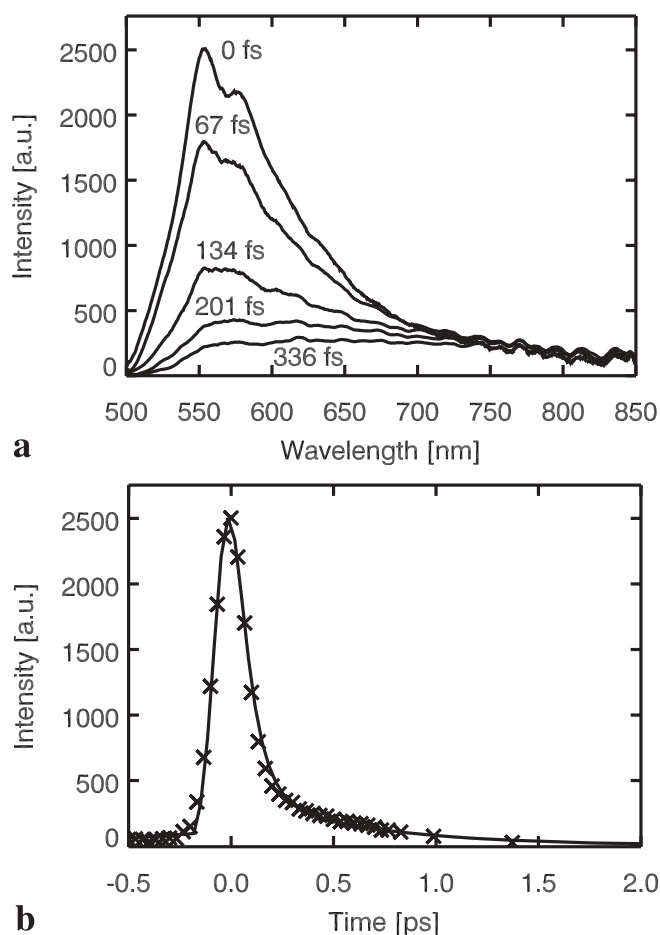


FIGURE 6 Time-resolved fluorescence spectra of 4-nitro-4'-dimethylaminoazobenzene in toluene. The data are corrected for the dispersion of time zero, the spectral sensitivity and the gate efficiency. **a** Time-resolved spectra. **b** Time trace at the maximum of the fluorescence spectrum. The *line* describes the result of the fit as described in the text

one component carrying only a small amplitude (see below). This behaviour is already visible in a single acquisition scan (recording time ~ 5 min, data not shown). In order to demonstrate the long-term stability of the set-up and to increase the signal-to-noise ratio, 50 scans were accumulated (Fig. 6). By inspections of the single scan data it was assured that no long-term drifts deteriorated the signal. The time-resolved emission spectra obtained in this fashion show pronounced spectral dynamics during their decay (Fig. 6). Immediately after excitation, a structured spectrum with a peak at 550 nm and a shoulder at 580 nm is observed. This spectrum decays rapidly to a broad unstructured emission (Fig. 6b). A bi-exponential fit with the instrumental response function set to 135 fs produces time constants of 80 fs and 620 fs. The amplitude of the 620 fs component amounts to 4.5% with respect to the 80 fs component. A rapidly decaying strong component and a longer lived contribution carrying a weak amplitude has already been observed for the parent compound azobenzene [20]. These up-conversion measurements yielded time constants of 200–300 fs and 1–2 ps for the two contributions, i.e. in the azobenzene derivative studied here, the photoisomerization seems to be accelerated as compared to the parent compound.

4 Conclusion

It has been demonstrated that the performance of a Kerr shutter for femtosecond fluorescence is strongly improved by using gate pulses centred at 1100 nm. Apart from a very weak emission around 550 nm, the gate pulses generate virtually no emission background in the spectral range from 350 nm to 1000 nm. This allows simultaneous acquisition of time-resolved emissions in this broad range. In addition, since in a Kerr shutter the gated fluorescence light is not shifted in frequency, a direct comparison between the stationary fluorescence spectrum and the time-resolved spectra is possible.

REFERENCES

- 1 S.A. Kovalenko, A.L. Dobryakov, J. Ruthmann, N.P. Ernsting: *Phys. Rev. A* **59**, 2369 (1999)
- 2 M. Seel, E. Wildermuth, W. Zinth: *Meas. Sci. Technol.* **8**, 449 (1997)
- 3 D. Block, J. Shah, A.C. Gossard: *Solid State Commun.* **59**, 527 (1986)
- 4 R. Schanz, S.A. Kovalenko, V. Kharlanov, N.P. Ernsting: *Appl. Phys. Lett.* **79**, 566 (2001)
- 5 M.A. Duguay: *Prog. Opt.* **14**, 161 (1976)
- 6 J. Takeda, K. Nakajima, S. Kurita, S. Tomimoto, S. Saito, T. Suemoto: *Phys. Rev. B* **62**, 10083 (2000)
- 7 S. Kinoshita, H. Ozawa, Y. Kanematsu, I. Tanaka, N. Sugimoto, S. Fujiwara: *Rev. Sci. Instrum.* **71**, 3317 (2000)
- 8 T. Wilhelm, J. Piel, E. Riedle: *Opt. Lett.* **22**, 1494 (1997)
- 9 R.A. Kaindl, M. Wurm, K. Reimann, P. Hamm, A.M. Weiner, M. Wörner: *J. Opt. Soc. Am. B* **17**, 2086 (2000)
- 10 P. Hamm, R.A. Kaindl, J. Stenger: *Opt. Lett.* **25**, 1798 (2000)
- 11 A. Ulman, C.S. Willand, W. Köhler, D.R. Robello, D.J. Williams, L. Handley: *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7083 (1990)
- 12 N. Sugimoto, S. Ito, S. Fujiwara, T. Suzuki, H. Kanbara, K. Hirao: *Opt. Commun.* **161**, 47 (1999)
- 13 J.E. Aber, M.C. Newstein, B.A. Garetz: *J. Opt. Soc. Am. B* **17**, 120 (2000)
- 14 D.R. Lide, H.P.R. Frederikse (Eds.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 76th edition (CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo 1996)
- 15 A.N. Macpherson, T. Gillbro: *J. Phys. Chem. A* **102**, 5049 (1998)
- 16 H. Kandori, H. Sasabe, M. Mimuro: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 2671 (1994)
- 17 M. Mimuro, S. Akimoto, S. Takaichi, I. Yamazaki: *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1452 (1997)
- 18 T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl: *Chem. Phys. Lett.* **272**, 489 (1997)
- 19 T. Fujino, S.Y. Arzhantsev, T. Tahara: *J. Phys. Chem. A* **105**, 8123 (2001)
- 20 Y.-C. Lu, C.W. Chang, E. W.-G. Diau: *J. Chin. Chem. Soc. Taip.* **49**, 693 (2002)

Femtosecond Fluorescence and Absorption Dynamics of an Azobenzene with a Strong Push–Pull Substitution

B. Schmidt, C. Sobotta, S. Malkmus, S. Laimgruber, M. Braun, W. Zinth, and P. Gilch*

Sektion Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, Oettingenstrasse 67, D-80538 München, Germany

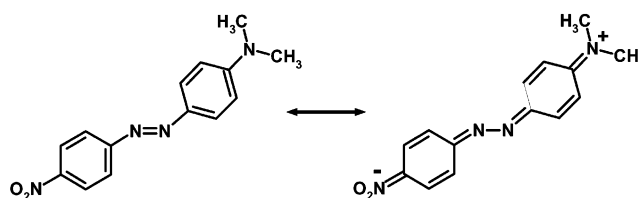
Received: January 30, 2004; In Final Form: March 12, 2004

The ultrafast photoisomerization of a push–pull substituted azobenzene (4-nitro-4'-(dimethylamino)azobenzene, NA) is studied by means of femtosecond fluorescence and absorption spectroscopy. The fluorescence dynamics is biphasic. The initial fluorescence with a narrow and intense spectrum decays in ~ 100 fs. This decay is accompanied by the rise of broad red-shifted and much weaker emission. The same time constants recur in the transient absorption spectra which hold additional information on the ground-state dynamics. The ground state recovers in 0.8 ps, demonstrating that only the longer time constant is associated with an internal conversion process. Small spectral changes occurring thereafter (~ 5 ps) point to vibrational cooling in the ground state. The results are analyzed in comparison with the behavior of the parent compound azobenzene. Though the push–pull substitution of azobenzene strongly alters the character of its excited states, the photodynamics are surprisingly robust with respect to that substitution.

1. Introduction

trans-Azobenzenes can be interconverted to their *cis* isomers and vice versa by photoexcitation. Because of the prototypical character of this isomerization, azobenzene and its derivatives have become one of the “hydrogen atoms” of femtochemistry. Femtosecond absorption and more recently fluorescence studies have established the time scale of this photoreaction to be of the order of 100 fs to 1 ps (see, e.g., refs 1–4). One central issue of these studies has been the mechanism of the isomerization (inversion versus rotation). A distinction between the two mechanisms based on spectroscopic results alone is difficult if not impossible. Thus, such studies have to be supplemented by quantum chemical calculations. Results of different calculations point to either mechanism, and the subject is therefore still under debate (a very recent status report can be found in the introduction of ref 5). We recently focused on *kinetic* differences in the photodynamics of the *trans* \rightarrow *cis* versus the *cis* \rightarrow *trans* direction by means of femtosecond transient absorption spectroscopy and continuous wave (cw) fluorescence spectroscopy.⁶ For the *trans* \rightarrow *cis* reaction the transient absorption spectrum attributed to the excited state predominantly decays with time constants of 0.34 and 3.0 ps which carry nearly equal amplitudes. The opposite direction is faster (0.1 ps) and nearly single exponential. To determine the origin of the biphasic behavior of the *trans* form, a quantitative comparison of the cw-fluorescence of the *trans* form and the *cis* form was performed. This comparison led to the conclusion that only the 0.34 ps component contributes significantly to the fluorescence emission. A time resolved fluorescence study indeed showed that the longer component—though not completely absent—has a much weaker amplitude in the time resolved fluorescence experiment as compared to the absorption measurement.⁴ The different signatures of the photodynamics of the *trans* form in the two spectroscopic techniques were attributed to the different radiative transitions predominantly detected by them:⁶ the

SCHEME 1



fluorescence experiment exclusively monitors the transition from the potential surface of the lowest excited state ($n\pi^*$) to that of the ground state S_0 . For azobenzene the energy gap of this transition depends strongly on the nuclear coordinates and should strongly decrease when moving along the reaction coordinate out of the Franck–Condon range. Therefore, the motion of the photoisomerizing azobenzene has a large impact on the time resolved fluorescence spectra. Since the absorption cross sections between the S_0 and the $n\pi^*$ surface are weak, the transient absorption signal is dominated by transition from the $n\pi^*$ state to higher excited states. Strong excited-state absorption may happen all over the $n\pi^*$ surface. Roughly speaking, the time dependence of the fluorescence emission monitors the motion of the excited molecule out of the Franck–Condon region, whereas the absorption signal reports this motion and the decay of the excited state. Apparently, in *trans*-azobenzene the motion out of the Franck–Condon range and the internal conversion to the ground state occur on different time scales; in the *cis* form such a partitioning of time scales does not exist.

In an attempt to investigate whether the biphasic behavior of the *trans* \rightarrow *cis* direction is rather general for azobenzenes or a peculiarity of the azobenzene parent molecule, we investigated a push–pull substituted azobenzene. Here results of a joint femtosecond absorption and fluorescence study on 4-nitro-4'-(dimethylamino)azobenzene (NA, see structure in Scheme 1) are presented. Azobenzene substituted only by a dimethylamino group has already been studied by femtosecond absorption spectroscopy⁷ and has been shown to undergo internal conver-

* Corresponding author. Fax: +49-89/2180-9202. E-mail: Peter.Gilch@physik.uni-muenchen.de.

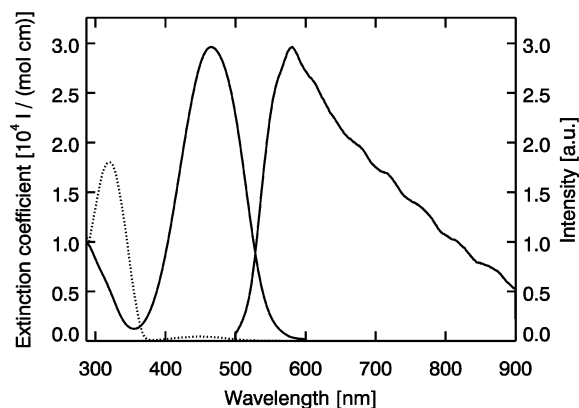


Figure 1. Steady-state absorption and emission spectra of *trans*-4-nitro-4'-(dimethylamino)azobenzene (NA) dissolved in toluene. The absorption spectrum of *trans*-azobenzene (dotted line) is included for comparison.

sion within ~ 1 ps. The time resolution of this study did not suffice to decide upon a biphasic behavior. The substitution pattern chosen here is expected to alter the electronic character and thereby the photodynamics more drastically than the above monosubstitution. The change of the electronic states becomes evident when comparing the absorption spectrum of NA with that of azobenzene (see Figure 1). Azobenzene has one weak electronic resonance in the visible at 440 nm which is attributed to an $n\pi^*$ excitation and stronger $\pi\pi^*$ transition in the UV around 310 nm (the spectroscopy of azobenzenes has been reviewed in ref 8). In NA these transitions nearly coincide and overlap with a charge transfer (CT) transition absent in azobenzene.⁹ Even in a solvent with a polarity as moderate as benzene this CT transition dominates the visible spectrum.⁹ The strong CT character of the visible transition of NA was also inferred from its resonance Raman spectrum.¹⁰ A detailed analysis of this spectrum yielded the initial structural distortion of NA upon photoexcitation which is in line with a transition from a neutral to a zwitterionic form as shown in Scheme 1. The change of the electronic character also alters the ground-state kinetic properties. While the thermal isomerization of azobenzene occurs within hours, nitroaminoazobenzenes reform their *trans* isomer on the time scale of minutes or even milliseconds depending on the solvent polarity.¹¹

In this paper we will (i) demonstrate the importance of a simultaneous application of femtosecond absorption and fluorescence techniques for the separation of excited- and ground-state dynamics in photoactive systems, (ii) present the influence of a strong push-pull substitution on the photoisomerization dynamics of azobenzene, and (iii) show that the biphasic nature of the reaction dynamics of *trans*-azobenzene is maintained also in push-pull substituted azobenzenes.

2. Experimental Section

The setup for femtosecond fluorescence experiments has been described before in detail in ref 12. In brief: The experiment is based on recording the fluorescence emission by a Kerr gate driven by femtosecond NIR pulses. Excitation pulses were generated from the output (~ 200 μJ) of a femtosecond laser/amplifier system (Clark CPA 2001 running at 775 nm with a repetition rate of 1 kHz) via a two-stage noncollinear optical parametric amplifier (NOPA) tuned to 480 nm. Compressed NOPA pulses with an energy of $\lesssim 1$ μJ were focused onto the sample cell. The emission generated by this excitation was collected with reflective optics and imaged onto the Kerr medium (a fused silica plate) placed between two wire grid

polarizers. The Kerr gate is operated by a femtosecond NIR laser pulse obtained from a two-stage optical parametric amplifier again pumped by a portion (250 μJ) of the amplifier output. Employing the NIR pulses at 1100 nm instead of the amplifier output has the advantage of opening the spectral region from 700 to 950 nm for fluorescence measurements and improving the temporal resolution. After passing the Kerr gate the fluorescence light is dispersed by a $f = 300$ nm spectrometer (Acton Research, Spectra Pro 300i) equipped with a 150 lines/mm grating blazed at 800 nm and detected with a liquid nitrogen cooled CCD camera (Princeton Instruments, Spec-10:400B). The recorded spectra were corrected for spectral sensitivity using a blackbody radiator as a reference. The duration of the instrumental response function of the setup is 130–150 fs (fwhm). The spectral dependence of time zero induced by the group velocity dispersion of the optical components was derived by recording the spectrotemporal behavior of a white light continuum generated at the sample location. When correcting for this dependence, the contribution of the solvent was added using tabulated values of the linear dispersion of the solvent. For the data presented here at every setting of the delay line the signal was accumulated for 5 s or 5000 laser shots; then signal traces of 20 scans of the delay line were averaged. To record steady-state fluorescence spectra this same setup was used where the gate pulses were blocked and the analyzer of the Kerr shutter turned to a parallel alignment.

The absorption experiments were performed using a setup based on a home-built Ti-sapphire laser chirped pulse amplifier (CPA) system operated at 800 nm.¹³ A single-stage NOPA pumped by the Ti:Sa amplifier (1 kHz) provided excitation pulses at 490 nm. These pulses were compressed to a duration of 40 fs by a prism compressor and focused onto the sample cell (optical path length 1 mm). At the sample location the excitation light had a diameter of 50 μm and an energy of 0.5 μJ . For the probing of the induced absorption changes, a white light continuum was generated by focusing a small portion of the amplifier output onto a 2 mm sapphire plate monitoring the absorption changes. The white light was split into a probe and a reference beam which both crossed the excitation beam at the sample location. The reference pulses arrived at the sample prior to the excitation pulse; the arrival of the probe pulses was adjusted by a delay stage. Probe and reference pulses were detected by a multichannel setup allowing the simultaneous acquisition of the transient absorption in a spectral range from 470 to 730 nm with a resolution of 6 nm. The time resolution of the setup was determined by analyzing the coherent artifact of the neat solvents¹⁴ to be 100 fs. This artifact, which is somewhat smaller than the actual signal, was properly scaled (considering the absorption of the solute) and subtracted from the raw signal to obtain the pure response of the solute. For the data presented here at every delay setting the signals of 100 laser shots were accumulated and the results of three scans were averaged. For special absorption experiments with higher time resolution the white light probe setup was replaced by a single-stage NOPA identical to the one used in the pump branch. That NOPA was tuned to 650 nm, and its output was compressed to 28 fs (fwhm). For the NOPA/NOPA pump probe experiments 100 laser shots were accumulated and five scans were averaged. The temporal resolution of this experiment was better than 40 fs.

4-Nitro-4'-(dimethylamino)azobenzene was synthesized according to ref 15, purified by recrystallization, and characterized by NMR. Concentrations of NA in the toluene solutions were chosen to reach an optical density (OD) in the 1 mm sample

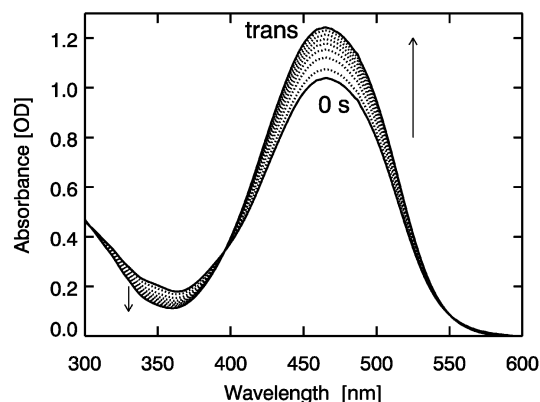


Figure 2. Absorption spectra of NA in toluene recorded after steady-state illumination at time intervals of 10 s indicating the reformation of the trans isomer.

cell of ~ 2 OD and ~ 1 OD for the fluorescence and the absorption experiments, respectively. Sample solutions were circulated rapidly through the sample cell to ensure a replacement of the sample after each laser shot. Large volumes of the sample solutions of ~ 10 – 100 mL were chosen to avoid accumulation of the cis photoproduct. (The cis isomer thermally reforms the trans isomer in ~ 70 s; therefore, the photostationary concentration of the cis isomer is negligible here.)

3. Results

3.1. Steady-State Spectroscopy. When the visible absorption band of NA in toluene peaking at 464 nm is excited with a NOPA pulse centered at 480 nm, a very weak fluorescence emission is recorded (Figure 1). The emission spectrum features a rather sharp rise to a maximum at 590 nm and a long tail extending to the NIR. Illumination of NA in toluene leads to a reduction of the absorption in the visible due to the cis formation (note that for azobenzene itself an increase of the visible absorption is observed). This reduction relaxes with a time constant of 70 s, the time constant of the cis \rightarrow trans reaction (Figure 2).

3.2. Femtosecond Fluorescence Spectroscopy. An overview of the fluorescence spectra recorded as a function of time is given in Figure 3a. As expected for a chromophore with a small fluorescence quantum yield, the fluorescence of NA decays very fast, within less than a few hundred femtoseconds (Figure 3). A closer inspection of this decay at two wavelengths (Figure 3b) shows the emission dynamics depends on the detection wavelength. At the blue edge of the emission spectrum (530 nm) the time trace is nearly symmetric, indicating that the fluorescence decay time is on the order of or below the instrumental response time which is equal to 150 fs (fwhm). In the red wing of the emission (800 nm) a significantly slower decay with a characteristic time of ~ 1 ps is observed. This wavelength dependence of the fluorescence lifetime is equivalent to a change of the emission spectra with time (Figure 3c). Immediately after photoexcitation the emission spectrum features the sharp peak also present in the steady-state spectrum (broken curve). However, the tail in the NIR is by far less pronounced. As the spectrum with the sharp peak decreases in amplitude, a very broad spectrum centered around 700 nm emerges which then decays in ~ 1 ps, thereby retaining its shape. This biphasic decay of the fluorescence emission is the origin of the peculiar shape of the cw spectrum of NA (see Figure 3c). The peak stems from a strongly emitting but very short lived species, and the tail is caused by the weak but longer lived emission centered at 700 nm. Prior to a numerical analysis of these results, a note

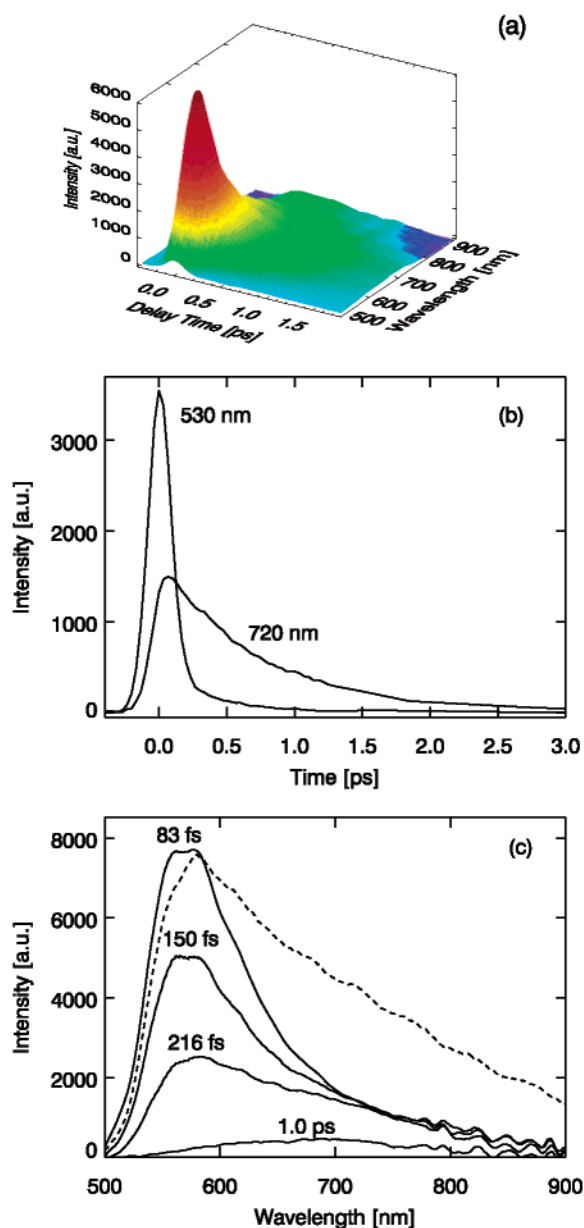


Figure 3. Time resolved fluorescence spectra of NA in toluene. (a) Overview. (b) Time traces at different wavelengths. (c) Time-dependent spectra at the delay times given in the figure. The steady-state fluorescence spectrum is plotted as a dashed line.

concerning inner filter effects is in place. The fluorescence light which is generated close to the front window of the sample cell has to pass that cell before it is detected. Thereby, it could be attenuated by either the static absorption of the sample (static inner filter) or its transient absorption (dynamic inner filter). The shape of the fluorescence spectrum does not change upon dilution; therefore, the static inner filter effect is not of importance here. As will be shown in the next section, the fluorescence emission overlaps spectrally with a transient absorption band which might distort the fluorescence signal (dynamic inner filter). However, by normalizing the fluorescence experiments to the excitation conditions of the absorption experiments, it can be shown that this effect does not surmount 10%. Therefore, considerations of dynamic inner filter effects will be disregarded in the discussion of the fluorescence decay.

To extract dynamic parameters on the fluorescence decay, the data were fitted globally using a multiexponential trial function convoluted with a Gaussian. The Gaussian represents

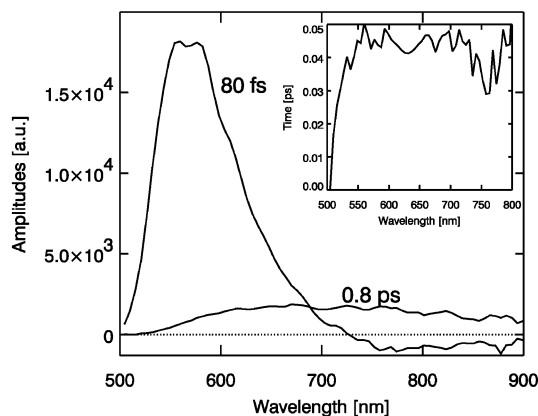


Figure 4. Decay associated spectra obtained by global analysis of the time resolved fluorescence data presented in Figure 3. The insert gives the time dependence of the “numerical” delay zero.

the experimental response function; its width was determined in an independent experiment on β -carotene to be 150 fs (fwhm). The decay traces at all wavelengths >550 nm are nicely reproduced by a biexponential trial function using two time constants. At the blue edge of the emission spectrum ($\lambda < 550$ nm) the global fit was only successful if the delay zero was treated as a free-fitting parameter (insert in Figure 4). This time zero shift is attributed to a molecular process occurring on a time scale of ~ 50 fs which is not accounted for in further discussion since its dynamics are faster than the instrumental response function of the emission experiment. The global fit yielded time constants of 80 fs and 0.8 ps. Most of the emission intensity decays with the 80 fs component, its amplitude being ~ 10 times higher than that of the 0.8 ps component. The spectrum associated with the 80 fs time peaks at 570 nm and features the sharp maximum around time zero in the time resolved spectra. Beyond 700 nm the spectrum of the 80 fs component is negative, indicating a delayed rise of the long-wavelength emission. The signal that emerges during that rise is strongly red shifted as compared to the 80 fs spectrum and extends to 900 nm. The decay of this spectral signature with a time constant of 0.8 ps terminates the emission of NA in toluene.

3.3. Femtosecond Absorption Spectroscopy. The results of the femtosecond absorption experiments on NA covering a broad spectral region from 470 to 730 nm are depicted in Figure 5a. The time resolution in these experiments (fwhm of the cross-correlation function) was equal to 100 fs. Immediately after photoexcitation at 490 nm the bleach of the ground-state absorption results in a negative difference absorption (bleach of the NA absorption) for wavelengths smaller than 530 nm. Toward longer wavelength a positive difference absorption spectrum is detected with a maximum at 650 nm and a shoulder at 580 nm. This transient absorption signal decays on the picosecond time scale, leaving a tiny offset at long delay times. In a second set of experiments the rise of the transient absorption is investigated at 645 nm (solid curve in Figure 5b). In these experiments the time resolution (fwhm of the cross correlation function) was equal to 37 fs. The rise of the transient absorption of NA is fast but slower than the experimental limit, which is represented by the convolution of the correlation function with an instantaneous rise (broken curve). A control experiment on the stimulated emission of the laser dye rhodamine 6G reproduces qualitatively the broken curve (data not shown). Apparently the signal rise in NA is delayed relative to the instantaneous response; i.e., a molecular relaxation process with

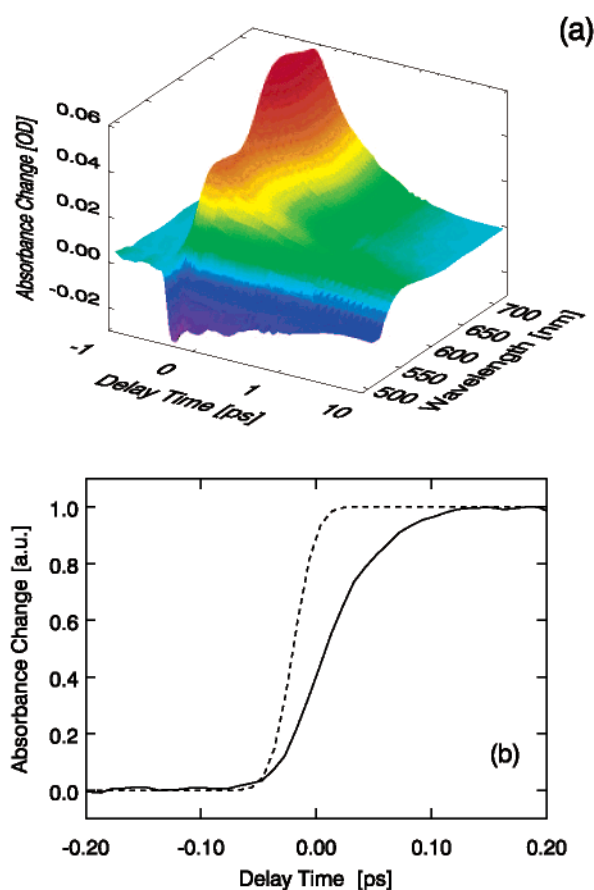


Figure 5. Transient absorption measurements on NA in toluene. (a) Overview. (b) Rise behavior of the transient absorption of NA at 645 nm (solid line) in comparison with the experimental rise determined from the measured cross correlation function (dashed line).

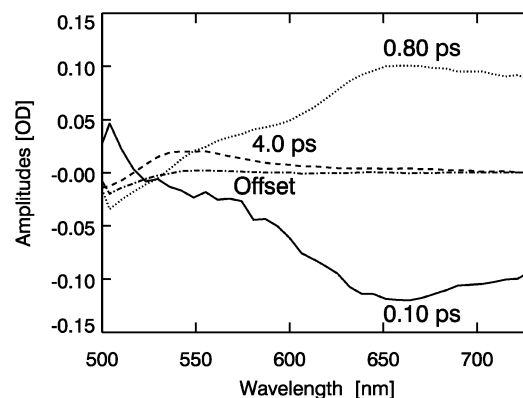


Figure 6. Decay associated spectra derived from the toluene absorption data. The corresponding time constants are given in the figure.

a fast time constant of 70 fs exists (obtained by fitting the time trace in Figure 5b) and determines the buildup of the absorption at 645 nm.

This delayed rise is more difficult to identify in the transient absorption spectra due to the limited time resolution of this experiment. A global fit procedure exerted on the transient spectra, however, recovers a time constant of the same order (100 fs versus the 70 fs determined above). The resulting decay associated spectra are depicted in Figure 6; the respective time constants are 100 fs, 0.8 ps, 4 ps, and infinity. The shortest time constant of ~ 100 fs is related to a negative difference spectrum representing the delayed rise of the long-wavelength absorption. The dominant part of the positive signal (increased

absorption) decays within ~ 0.8 ps. This decay is accompanied by a partial recovery of the ground-state absorption spectrum. The remaining part of the signal decays in some picoseconds (4 ps) and changes sign around 520 nm. A very small offset (absorption changes at late times) follows the steady state *cis*–*trans* difference spectrum.

4. Discussion

The most prominent experimental observations are the following: (i) Fluorescence emission has a strong contribution decaying with $\tau = 100$ fs. (ii) This fluorescence emission is strongly red shifted and shows a narrow peak at 575 nm. (iii) A weaker emission at still longer wavelengths (broad peak at 700 nm) decays with $\tau = 0.8$ ps. (iv) The transient absorption changes display the same time constants. (v) The longer time constant is related to the decay of strong absorption changes. (vi) The short time constant is mainly connected with the rise of absorption changes.

We now want to present a molecular model which is able to describe the experimental observations. The existence of fluorescence emission decaying with the two time constants of 100 fs and 0.8 ps indicates that these processes must be connected to reactions in the excited electronic state or to internal conversion to the ground state. A very striking feature which has to be explained first is the strong red shifted fluorescence spectrum of NA observed immediately after photoexcitation (Figure 3) peaking at 575 nm. The peak wavelength corresponds to a Stokes shift $\Delta\nu_s$ of 4200 cm^{-1} . This Stokes shift between absorption and fluorescence should be related to the reorganization energy λ associated with the optical transition. If the excited-state lifetime is longer than the vibrational and solvent relaxation times, the shift $\Delta\nu_s$ should be equal to 2λ . A resonance Raman study on NA in benzene⁹ yielded a total reorganization energy of 2429 cm^{-1} . This energy was partitioned into a high-frequency intramolecular contribution λ_v of 1004 cm^{-1} and a solvent portion λ_s of 1425 cm^{-1} . The solvent reorganization energy λ_s was subdivided into a fast inertial part λ_i of 630 cm^{-1} and slow diffusive part λ_r of 795 cm^{-1} . The Stokes shift $\Delta\nu_s$ observed here corresponds to an effective reorganization energy of 2100 cm^{-1} , which indicates that the relaxation of the high-frequency contribution λ_v and of a major part of the solvent contribution λ_s has occurred within the instrumental response time of the femtosecond experiment, i.e., within ~ 100 fs. A residual dynamic signature of the buildup of the Stokes shift is the time dependence of delay zero depicted in Figure 4, insert, which is equivalent to a red shift of the early emission spectrum with time. This red shift presumably stems from the slower contributions to the solvent reorganization energy. An analysis of this dynamic Stokes shift is not possible since its initial parts are extremely fast and since the slower parts are truncated by the decay of the emission after 100 fs. These observations are in line with the resonance Raman results. The distortions of NA upon photoexcitation derived from this Raman study can be completely assigned to the transition from the neutral form of NA to the zwitterionic structure (see Scheme 1); no signature of a distortion due to the *trans* \rightarrow *cis* isomerization was detected.

The onset of this isomerization may be connected to the ~ 100 fs decay of the intense fluorescence signal centered around 575 nm. This decay is most likely not associated with a transition between different excited states. As shown by analysis of the absorption spectrum of NA,⁹ the primarily excited state (the CT state) is lowest in energy; thus a transition between this state and for instance the $n\pi^*$ state cannot occur. We, therefore,

assign this decay to a large amplitude motion on the excited-state surface along the isomerization coordinate. This motion brings the excited molecule closer to a conical intersection with the ground state. This 100 fs process is not associated with the decay of the excited state: The disappearance of the intense emission around 575 nm goes along with the rise of a weak and broad emission spectrum at 700 nm which demonstrates that NA is still in its excited state after the 100 fs process. A partial decay to the electronic ground state with 100 fs is excluded by the absorption experiments. The time traces in the spectral region of the ground-state absorption lack the 100 fs contribution (see Figure 6); i.e., the ground state is not partially recovered with 100 fs. The strong decrease of the emission intensity within 100 fs is thus not a consequence of the depletion of the excited state but is due to the change (decrease) of the emission probability. The ground-state absorption only recovers with a time constant of 0.8 ps as can be seen from the transient absorption traces in Figure 5. The broad emission spectrum associated with the 0.8 ps might be an indication that the localized vibrational wave packet generated by the photoexcitation gets spread over the potential energy surface and does not immediately find the conical intersection to the ground state.

From the transient absorption data we learn that optical excitation initially populates a state, which shows very small absorption changes. It is only with the decay of this state (within 80–100 fs) that the strong transient absorption of the excited state (see Figure 5) is built up. Apparently the molecular configuration of NA is changed with the 100 fs process in a way to yield the broad increased absorption between 550 and 750 nm. The molecule has moved along the reaction coordinate away from the Franck–Condon region.

The strong excited-state absorption decays with the 0.8 ps time constant. Very little absorption change is left afterward. Thus the absorption of the ground-state NA molecules is essentially reformed. This observation together with the transient fluorescence emission signal clearly proves that the 0.8 ps process is connected to the decay of the excited state and the formation of a ground-state molecule (in the *cis* or the initial *trans* form). The subsequent 4 ps dynamic process has a spectral signature—absorption decrease on the long-wavelength side of the NA absorption and an increase toward the absorption peak—indicative for vibrational cooling. This behavior is well expected since most of the excitation energy is still stored in the vibrations of the NA molecule. The time scale for this cooling process is typical for molecules of that size¹⁶ and is comparable with values obtained for azobenzene (see below).² The weak absorbance change remaining at later delay times shows the signature for the formation of *cis*-NA and can be assigned to the isomerized molecules.

The absorption dynamics of NA are surprisingly similar to those of the parent molecule azobenzene. Differences originate mainly from the changed character of the initially excited state: an $n\pi^*$ character for azobenzene and a CT character for NA. Transient absorption measurements on *trans*-azobenzene in ethanol yielded biphasic time traces for the excited-state dynamics with time constants of 0.32 and 2 ps.² This compares with the values of 0.1 and 0.8 ps reported here; i.e., a moderate acceleration is observed in NA. The femtosecond fluorescence signatures are again very similar. The *trans*-azobenzene fluorescence decay (in hexane) can be described biexponentially.⁴ A fast 200 fs component carries most of the amplitude and is most dominant in the blue part of the fluorescence spectrum. When moving to the red a longer lived contribution gains some amplitude. This—apart from the numerical values of the time

constants—exactly mirrors the temporal behavior found in NA. Thus the interpretation put forward for the behavior of fluorescence of azobenzene also seems to apply to NA. After photoexcitation a steep slope of the excited-state surface drives the vibrational wave packet out of the Franck–Condon vicinity. This movement occurring in ~ 100 fs in NA reduces the fluorescence emission probability drastically. After that rapid initial motion the wave packet “meanders” on the excited-state surface searching of the conical intersection to the ground state, resulting in a strongly red shifted and broad emission. The internal conversion to the ground state in ~ 0.8 ps partially replenishes the trans ground state and forms the cis isomer. The cooling of these nascent ground states seems to be somewhat faster in NA than in azobenzene, for which values of 12 ps in DMSO⁶ and ~ 10 ps in ethanol² were reported. The faster cooling rate can be attributed to the polar character of NA which might increase the solute solvent coupling and the larger number of degrees of freedom due to the dimethylamino group and the nitro group.

In conclusion, the combination of femtosecond fluorescence and absorption techniques allowed obtaining a detailed picture of the excited-state dynamics of 4-nitro-4'-(dimethylamino)-azobenzene. Three stages could be separated: (i) Inter- and intramolecular modes adapt extremely rapidly (< 100 fs) to the new charge distribution caused by the CT excitation. (ii) Within 100 fs a large amplitude motion on the excited-state potential away from the Franck–Condon region takes place. (iii) A “search” of the conical intersection to the ground state taking ~ 1 ps terminates the excited-state dynamics. The last two stages are very similar to what is observed in the parent compound azobenzene, indicating that a push–pull substitution of azobenzene has little impact on the photoisomerization dynamics. Based on the spectroscopic results presented here, a distinction between

an inversion or rotation mechanism is not possible yet. However, the detailed time resolved fluorescence data should be much more accessible to a comparison with quantum chemical calculations than absorption data, since only the ground-state surface and *one* excited-state surface have to be determined.

References and Notes

- (1) Lednev, I.; Ye, T.; Hester, R.; Moore, J. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13338.
- (2) Nägele, T.; Hoche, R.; Zinth, W.; Wachtveitl, J. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *272*, 489.
- (3) Fujino, T.; Arzhantsev, S.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 8123–8129.
- (4) Lu, Y.-C.; Chang, C.; Diao, E. W.-G. *J. Chin. Chem. Soc. Taip.* **2002**, *49*, 693.
- (5) Diao, E. W.-G. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 950.
- (6) Satzger, H.; Spörlein, S.; Root, C.; Wachtveitl, J.; Zinth, W.; Gilch, P. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *372*, 216.
- (7) Mayer, S. G.; Thomsen, C. L.; Philpott, M. P.; Reid, P. J. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *314*, 246.
- (8) Rau, H. Azo Compounds. In *Studies in Organic Chemistry, Photochromism, Molecules and Systems*; Dürr, H., Bouas-Laurent, H., Eds.; Elsevier-Verlag: Amsterdam, 1990; Vol. 40.
- (9) Biswas, N.; Umamathy, S. *J. Raman Spectrosc.* **2001**, *32*, 471.
- (10) Biswas, N.; Umamathy, S. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 5526.
- (11) Gille, K.; Knoll, H.; Quitzsch, K. *Int. J. Chem. Kinet.* **1999**, *31*, 337.
- (12) Schmidt, B.; Laimgruber, S.; Zinth, W.; Gilch, P. *Appl. Phys. B* **2003**, *76*, 809.
- (13) Baigar, E.; Gilch, P.; Zinth, W.; Stöckl, M.; Härter, P.; von Feilitzsch, T.; Michel-Beyerle, M. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *352*, 176.
- (14) Kovalenko, S.; Dobryakov, A.; J., R.; Ernsting, N. *Phys. Rev. A* **1999**, *59*, 2369.
- (15) Ulman, A.; Willand, C.; Köhler, W.; Robello, D. R.; Williams, D. J.; Handley, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7083.
- (16) Seilmeier, A.; Kaiser, W. Ultrashort Intramolecular and Intermolecular Vibrational Energy Transfer of Polyatomic Molecules in Liquids. In *Topics in Applied Physics*; Kaiser, W., Ed.; Elsevier-Verlag: Amsterdam, 1993; Vol. 60.

Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy

B. Schmidt, C. Sobotta, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, P. Gilch*

Department für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, Oettingenstr. 67, D-80538 München, Germany

Received 18 August 2004; received in revised form 4 October 2004; accepted 20 October 2004

Available online 13 November 2004

Abstract

The impact of varying excitation densities (~ 0.3 to ~ 40 photons per molecule) on the ultrafast fluorescence dynamics of bacteriorhodopsin has been studied in a wide spectral range (630–900 nm). For low excitation densities, the fluorescence dynamics can be approximated biexponentially with time constants of <0.15 and ~ 0.45 ps. The spectrum associated with the fastest time constant peaks at 650 nm, while the 0.45 ps component is most prominent at 750 nm. Superimposed on these kinetics is a shift of the fluorescence maximum with time (dynamic Stokes shift). Higher excitation densities alter the time constants and their amplitudes. These changes are assigned to multi-photon absorptions.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Excited state; Bacteriorhodopsin; Femtosecond fluorescence

1. Introduction

Photosynthetic activity in halobacteria is based on the membrane protein bacteriorhodopsin (BR), which acts as a light-driven proton pump [1]. BR consists of 248 amino acids and contains only one chromophore, a retinal molecule, which is linked via a protonated Schiff base to the lysine 216 of the sequence of the protein. In the functionally active light-adapted form of BR, the retinal molecule adopts the all-*trans* configuration. Its function is initiated by the all-*trans* \rightarrow 13-*cis* photoisomerisation of the retinal molecule after photoexcitation. This primary step in the photocycle proceeds on the picosecond time scale and is very efficient (quantum yield ~ 0.6 [2–5]).

The dynamics of this primary step have been the topic of many time-resolved transient absorption measurements [2,6–12]. Early studies [2,6,7] have revealed a sub-picosecond decay of the first excited state S_1 after optical

excitation. Later transient absorption experiments have shown the ultrafast dynamics of BR in more detail. Immediately after excitation, a broad transient hole appears in the absorption spectrum whose amplitude remains constant for about 0.2 ps [9]. For the initial excited state dynamics, a biphasic behaviour with time constants of <0.15 and ~ 0.45 ps is observed [8,11]. Studies with high time resolution also find an oscillatory behaviour of the transient absorption signal due to wavepacket motion on the excited state and the ground state surface [12–14]. Subsequent to the decay of the S_1 state within ~ 0.45 ps, a red-shifted absorption band is observed, which can be associated with the buildup of the J intermediate [8,10,11]. This absorption decays within 3–5 ps, indicating the transition of the J intermediate to the K ground state [2,5].

Transient absorption experiments probe processes in the ground state and the excited states. Ground state bleaching, stimulated emission, excited-state absorption, wavepacket motions and absorbance changes due to the formation of photoproducts overlap in the spectra and have to be deconvoluted to distinguish ground state dynamics from excited-state dynamics. This makes it difficult to assign processes to excited states unambiguously. Here, time-

* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 9243; fax: +49 89 2180 9202.

E-mail address: Peter.Gilch@physik.uni-muenchen.de (P. Gilch).

resolved fluorescence spectroscopy is superior since only electronically excited states show fluorescence emission.

So far, only a few time-resolved fluorescence measurements of the primary step of the photocycle of BR in the femtosecond regime have been reported [15,16]. Du and Fleming [15], using the up-conversion method, excited their sample at 608 nm with 3 nJ pulse energy at a repetition rate of 100 kHz. The pump-gate cross-correlation function of these experiments had a FWHM of 0.06–0.07 ps. They reported time constants of 0.09–0.24, 0.6–0.9 and 9.0–13.0 ps. The amplitude of the third time constant has been specified with up to 25%. Haacke et al. [16], also using the up-conversion method, excited their sample at 585 nm with a repetition rate of 80 MHz. A time resolution of 0.25 ps was achieved in these experiments. The data have been treated biexponentially with a short time constant in the sub-picosecond range and a longer time constant of 10 ps. The short time constant varies with the detection wavelength and values increasing from 0.15 to 0.4 ps when moving towards longer wavelengths have been determined. The second time constant of 10 ps carrying only a small amplitude of 4% was found to be wavelength independent. Both experiments draw a similar picture of the fluorescence dynamics of BR; nevertheless, distinct deviations concerning especially the sub-picosecond behaviour and the amplitude of the long time constant are present. These deviations may be due to different excitation conditions and could be clarified by examining the fluorescence dynamics of BR as a function of excitation density.

In this paper, we present results of time-resolved fluorescence measurements with a Kerr gate set-up. The BR sample has been excited from the ground state to the first excited state with different excitation densities ranging from ~ 0.3 to ~ 40 photons per molecule. These experiments give new insight in the fluorescence dynamics of BR.

2. Experimental

The femtosecond fluorescence experiments used a set-up based on a Kerr gate described in detail in Ref. [17]. Here only the most important features are described. Briefly, a part of the output ($\sim 200 \mu\text{J}$) of a femtosecond laser/amplifier system (Clark CPA 2001 operated at 775 nm with a repetition rate of 1 kHz) pumped a two-stage noncollinear optical parametric amplifier (NOPA) tuned to 565 nm. Compressed NOPA pulses of ~ 0.05 ps were used as excitation source and were focused onto the sample cell. The excitation pulses were polarised under an angle of 45° with respect to the polarisation plane of the detection. The emission generated by this excitation was collected with reflective optics and imaged onto the Kerr medium (a fused silica plate) placed between two wire grid polarisers.

The excitation density as used in the following is defined as the product of the absorption cross section of BR and the photon density (number of photons per area). It thus

represents the number of photons a BR molecule actually ‘sees,’ when excited with a laser pulse with a certain energy (regardless of the duration of the laser pulse and the concentration of BR molecules). The extinction coefficient of BR of $\sim 6 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [2,8] translates into an absorption cross section of $\sim 2.3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$. The photon density is calculated by dividing the number of photons per pulse by the focal area of the excitation spot. The excitation spot diameter was varied between 80 and 160 μm by adjusting an aperture in the beam path and measured by a homebuilt beam profile analyser at the sample location. The energy of the excitation pulses was varied between ~ 100 and ~ 3600 nJ per pulse. The excitation densities determined from these parameters range from ~ 0.3 (pulse energy ~ 100 nJ at an excitation spot size of 160 μm) to ~ 40 (pulse energy ~ 3600 nJ at an excitation spot size of 80 μm) photons per molecule.

An excitation density of 0.3 photons per molecule was shown to be a good compromise between signal to noise ratio and retaining a linear excitation regime. This was verified by performing experiments with an excitation density as low as 0.07 photons per molecule. No systematic deviation between the 0.07 and the 0.3 run could be detected. Trivially, the 0.3 run features a better signal-to-noise ratio and it was thus used to extract the numerical parameters for the linear regime.

Obviously, not only the excitation density but also the light intensity has to be considered when discussing the presence or absence of nonlinear signal contribution. The light intensity of the 0.3 run was equal to $\sim 10^{10} \text{ W cm}^{-2}$, which is of the same size or even lower than the intensities commonly employed in transient absorption experiments on BR [8,10,11,18–20].

The Kerr gate is operated by 0.045 ps NIR laser pulses at 1100 nm generated by a two-stage optical parametric amplifier again pumped by a portion (250 μJ) of the CPA output. The use of NIR pulses at 1100 nm from the OPA instead of fundamental CPA pulses at ~ 800 nm has the advantage that it opens the spectral region from 700 to 950 nm for fluorescence measurements and improves the temporal resolution. After passing the Kerr gate, the fluorescence light is dispersed by a $f=300$ mm spectrograph (Acton Research, Spectra Pro 300i) equipped with a 150 lines/mm grating blazed at 800 nm and detected with a liquid nitrogen cooled CCD camera (Princeton Instruments, Spec-10:400B).

The spectra reported here are corrected for the spectral sensitivity of the set-up and for the λ^2 -dependence of the gate efficiency (for details, see Ref. [17]). A dielectric mirror placed in front of the spectrometer to reject the light of the gate pulses introduces modulations of the spectra. Though this measurement artefact has been corrected to the best of our knowledge; slight modulations remain nevertheless. These modulations are the origin of the step-like shape of the data in Fig. 2. The duration of the instrumental response function of the set-up is ~ 0.15 ps (FWHM). Its

width was determined in an independent experiment using spontaneous Raman scattering of water as a reference.

The spectral dependence of time zero induced by the group velocity dispersion of the optical components was derived by the following procedure. The BR sample was replaced by pure water and a white light continuum was generated at an increased pump pulse energy in the water-filled sample cell. The continuum is generated via a nonlinear off-resonant process, which is assumed to be instantaneous on the time scale of our experiment. Therefore, in the sample cell, all spectral components of the continuum are generated at the same instant. Due to dispersion the spectral components then collect wavelength dependent delays on their way to the Kerr medium. These delays were determined by measuring the peak position of the continuum pulse along the time axis at a given wavelength. The resulting time zero dependence is in good agreement with predictions based on the dispersion data of the materials involved. The recorded fluorescence data were corrected using these peak positions. The uncertainty of this time zero correction is estimated to be about ± 0.02 ps and stems mainly from the uncertainty of the exact position of the white light generation in the 1.0-mm-thick sample cell.

For the data presented here at every setting of the delay line the signal was accumulated for 3–6 s or 3000–6000 laser shots, then signal traces of 12–24 scans of the delay line were averaged.

Isolation of bacteriorhodopsin from cells was carried out according to the standard procedure [21]. After lysis of the cells in the presence of DNase I (Sigma, Steinheim, Germany), the resultant membrane fragments were washed with water and then purified by centrifugation on a sucrose gradient (25–45% w/w). Membrane fractions of buoyant density 1.18 g/ml were collected, washed repeatedly with water and then resuspended in the appropriate buffer solution (pH=7.5) for spectroscopic measurements. The samples were circulated through fused silica flow cells with an optical path length of 1.0 mm.

The absorbance of the sample was 2.0 OD at 568 nm. In the experiments on the intensity effects, this high optical density in combination with the cell length of 1.0 mm can lead to intensity-dependent penetration depths. These in turn might deteriorate the temporal resolution in the high-intensity experiments due to group velocity differences between excitation and fluorescence light. Calculations based on water dispersion data predict maximal apparent shifts in the temporal behaviour of the fluorescence of 0.04 ps. In this prediction, it was assumed that fluorescence light stemming from the whole length of the sample cell contributes to the signal. Yet, the optics used to collect the fluorescence light have a depth of field of 0.5 mm at best. Therefore, these shifts are not expected to be higher than 0.02 ps, being smaller than all other temporal effects discussed here.

Attention was paid to adjust the circulation speed, such that the sample was replaced after each laser shot. BR was light-adapted by continuous illumination with the light of a

cold light source (KL 2500 LCD, Schott), which passed OG 550 and KG 5 filters, which suppress the UV and NIR part of the spectrum, respectively.

3. Results

3.1. Low excitation density

In order to investigate BR under conditions similar to native, we performed experiments where the excitation density was kept at 0.3 photons per BR molecule. Under these conditions, nonlinear signal contributions are highly unlikely (see “Experimental” and the next section). BR excited with femtosecond pulses at 565 nm emits a broad and very short lived fluorescence (Fig. 1a). In the spectral range (630 nm–900 nm) covered by the Kerr gate set-up, this emission decays on the sub-picosecond to picosecond time scale. A qualitative analysis shows a predominant fast-decay component in the blue part of the spectra and a somewhat slower (~ 0.5 ps) decay component in the red part of the spectra. Additionally, there is also a picosecond decay

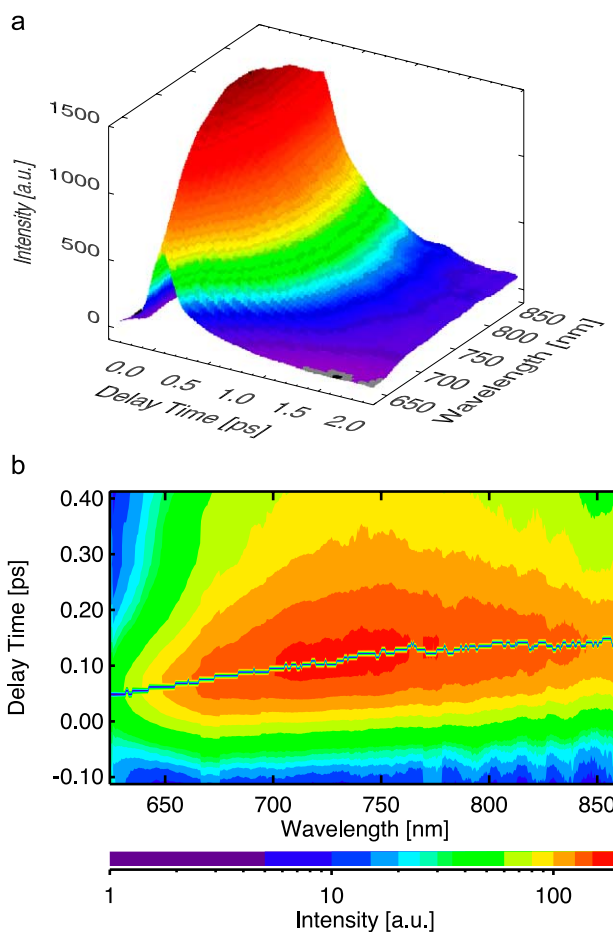


Fig. 1. Time-resolved fluorescence spectra of bacteriorhodopsin excited at low excitation density (~ 0.3 photons per molecule). (a) Overview. (b) Contour plot of the behaviour around time zero. The line represents the peak of the fluorescence at a given wavelength.

component with a rather small amplitude that can be seen as a small offset at later delay times.

In addition to these decay patterns, a spectral shift on the time scale of a few 0.1 ps is observed. To illustrate this shift, we first adopt the usual representation and plot the fluorescence maxima at a given delay time versus that time (Fig. 2). From this representation, it seems to be clearly evident that the fluorescence emission red shifts with time. Immediately after photoexcitation, the maximum of the fluorescence is located at 650 nm. It then approaches the steady state maximum of 750 nm in about 0.2 ps and remains nearly constant thereafter. Assigning these features to a dynamic Stokes shift seems to be close at hands. However, the wavelength-dependent decay kinetics mentioned above could also mimic such a shift. An analysis of this contribution is easier when using a different representation of the shift dynamics. In Fig. 1b, we mark the peak of the fluorescence intensity along the time axis for a given wavelength. Trivially, in that representation, a shift is also present. The peak moves to longer delay times for increasing wavelengths. This dependence could stem from the aforementioned increasing decay times towards longer wavelengths. For a finite instrumental response time, an increased decay time moves the peak of the fluorescence intensity to later delay times. Simulations demonstrate that this effect is indeed present but not sufficient to explain the experimentally observed shift (see Fig. 3). Depicted is the emission as a function of time (time traces in the following) recorded at the blue (650 nm, crosses) and the red side (800 nm, triangles) of the fluorescence spectrum. The peaks of these time traces are ~ 0.08 ps apart. We tried to reproduce this effect by fitting the data using a common time zero for the 650 and 800 nm time trace (Fig. 3, solid and dashed line). A prolonged decay time at 800 nm indeed shifts the peak towards longer delay times. However, this accounts for only less than one third of the experimentally observed shift. Thus, we are indeed dealing with a dynamic Stokes shift.

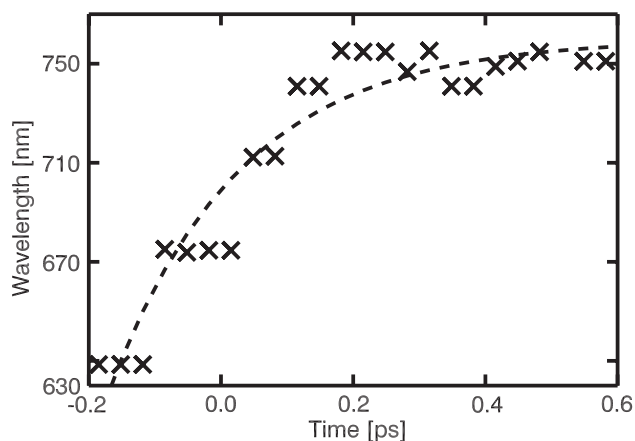


Fig. 2. Dynamic Stokes shift of the fluorescence spectra of bacteriorhodopsin (excitation with low excitation density, ~ 0.3 photons per molecule). The step-like shape of the data results from the measurement artefact mentioned in “Experimental”. The dashed line is inserted as a guide to the eye.

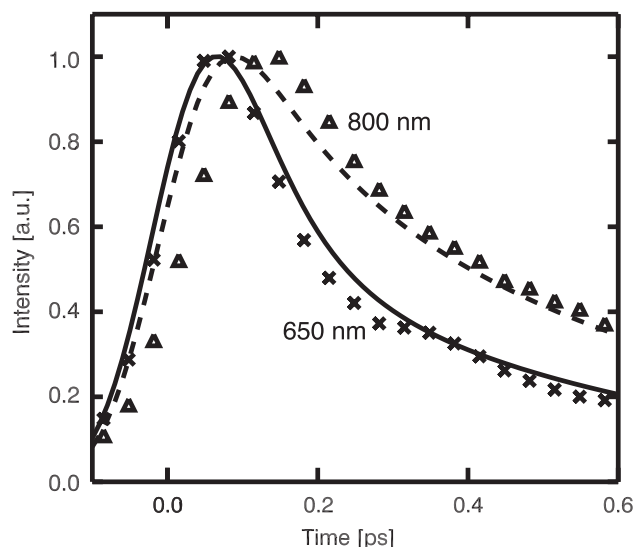


Fig. 3. Normalised time traces of BR. Experimental data points are plotted for 650 nm (crosses) and 800 nm (triangles). Simulated time traces at 650 nm (solid line) and 800 nm (dashed line) are plotted with a common time zero. The simulated shift of the maxima accounts only for one third of the experimentally observed shift.

Dynamic parameters on the fluorescence decay were extracted by a global fitting routine using a multiexponential trial function convoluted with a Gaussian. The Gaussian represents the experimental response function. In this fitting routine, the time zero was treated as a free parameter for all wavelengths to mimic the effects of the dynamic Stokes shift.

The decay traces at all wavelengths >630 nm are nicely reproduced by a trial function using three time constants. The global fit yielded time constants of $\tau_1 \sim 0.05$ to 0.15 ps, $\tau_2 \sim 0.45$ ps and $\tau_3 \sim 3$ to 10 ps. The amplitude related to the fast time constant has its maximum around 650 nm and decays towards the red part of the spectra. The presence of a dynamic Stokes shift indicates that an exponential model cannot handle the data properly in the first few 0.1 ps. Thus, the value for the shortest time constant given above is an approximation—not only numerically but also conceptually. As the second (~ 0.45 ps) and third (~ 3 to 10 ps) time constants are longer than the dynamic Stokes shift, a rate model is better justified for the determination of their value. The amplitude maximum of the second time constant peaks around 750 nm, the maximum of the steady state fluorescence (decay associated spectra not shown here). The third time constant has a very broad spectrum with its amplitude maximum shifted even further to longer wavelengths. Since the amplitude is relatively low ($<5\%$ of the initial fluorescence emission), only a wide range of 3–10 ps can be given for this time constant.

3.2. High excitation density

In a series of time-resolved fluorescence measurements, the excitation density was raised in several steps from 0.3 to 40 photons per molecule. All experiments with excitation

densities below ~ 1 photon per molecule yielded results identical to the 0.3 run described above. Experiments with excitation densities ranging from 1 to 40 photons per molecule showed increasing deviations in the spectro-temporal behaviour of the data.

At three different detection wavelengths (650, 730 and 800 nm), decay traces are plotted on a logarithmic scale versus delay time (see Fig. 4). The solid line represents the fluorescence signal of BR at low excitation density of ~ 0.3 photons per molecule. The dashed line represents the fluorescence signal of BR at high excitation density of ~ 40 photons per molecule. Two significant changes are observed:

- (i) The amplitude of the fastest time constant (< 0.15 ps) strongly increases with increasing excitation density. This effect becomes more pronounced at longer

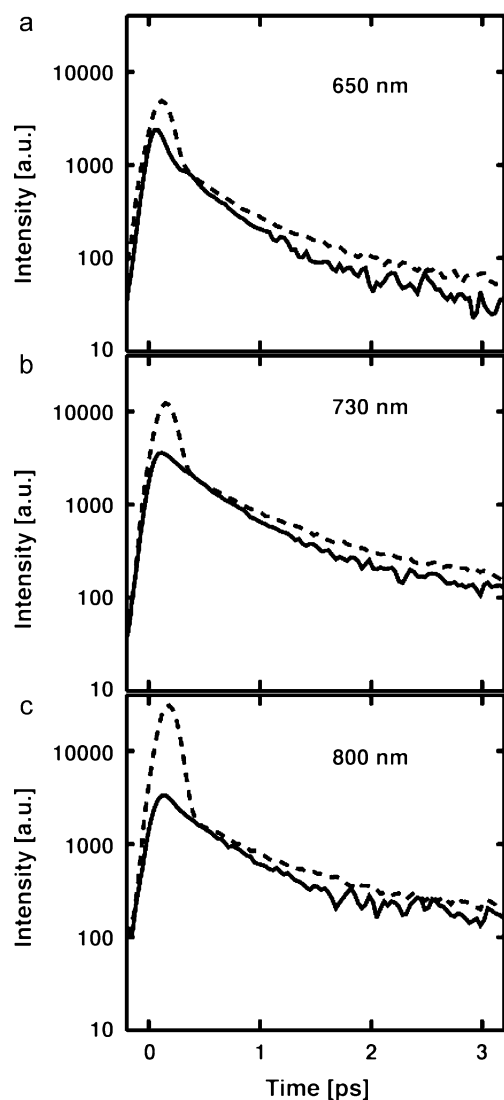


Fig. 4. Time traces at different wavelengths and excitation densities (solid line: ~ 0.3 photons per molecule, dashed line: ~ 40 photons per molecule). The different time traces have been normalised with respect to each other at ~ 0.3 ps. (a) 650 nm; (b) 730 nm; (c) 800 nm.

wavelengths. Also, a shift of the peak of the fluorescence towards later delay times is observed (see Fig. 4, dashed lines).

- (ii) The decay time of the second time constant increases from ~ 0.45 to ~ 0.7 ps with increasing excitation density (see also Fig. 4, dashed line). The spectral signature of the amplitudes of the second time constant does not show a dependence on the excitation density.

4. Discussion

The experimental results can be summarised as follows. At low excitation density, a biphasic behaviour with time constants of < 0.15 and ~ 0.45 ps and a dynamic Stokes shift of the fluorescence maxima towards longer wavelengths are observed. At high excitation density, there is at all wavelengths a strong and fast decaying emission. The time constant of the slower component is increased from ~ 0.45 to ~ 0.7 ps.

4.1. Low excitation density

Time-resolved fluorescence spectra of molecular systems undergoing ultrafast photoreactions are expected to feature the following characteristics. (i) Due to a (damped) motion on the excited state surface, the energy gap between ground and excited state decreases with time. Such dynamic Stokes shifts are observed in molecular systems with bound and reactive excited state potential energy surfaces. In bound systems, this effect is often due to the dielectric relaxation of the solvent surrounding the excited molecule [22,23]. The shift induced by this relaxation conserves (apart from the ν^3 factor) the spectrally integrated fluorescence intensity. In reactive systems, in addition to these solvent-induced effects, shifts caused by a motion along reactive internal coordinates may take place. (ii) In the course of these large amplitude motions, the Franck–Condon factors for the emission and/or the transition dipole moments may vary causing a variation (usually a reduction) of the spectrally integrated fluorescence intensity [23,24]. Such intensity effects are frequently observed in time-resolved spectra of molecules undergoing ultrafast processes. Examples range from azobenzenes [25,26] over nitroanilines [27] to triarylpyrylium dyes [24]. These experimental findings are in line with quantum chemical calculations [27,28] that often predict a substantial change of the transition dipole moment upon large amplitude motion. (iii) Following these processes in the excited state, its depletion by internal conversion then terminates the fluorescence emission.

In the fluorescence data on BR reported here, all these features can be identified. The peak of the fluorescence spectra moves towards longer wavelengths with a characteristic time of ~ 0.2 ps (dynamic Stokes shift). Concomitant with that shift, a decay of the overall fluorescence intensity on the very same time scale is observed

(reduction of the emission probability). Finally, with a time constant of 0.45 ps, the greater part of the fluorescence intensity is terminated (internal conversion). The last two features are recovered in transient absorption experiments in which a biphasic decay of excited state signatures with time constants of 0.1–0.2 and \sim 0.5 ps is observed [8,9,11]. The recovery of the ground state and the formation of photoproducts proceeds with the slower of the two time constants [11]. This further substantiates the notion that the $<$ 0.2-ps decay time is *solely* due to processes in the excited state and not to a partial decay of this state.

Surprisingly, the spectral shift reported here has not been mentioned in the literature hitherto. This applies to time-resolved absorption as well as to fluorescence experiments. In fact, most of the transient absorption experiments claim a nearly instantaneous rise of the stimulated emission [10,11,14,18]. There are, however, indications for such a shift. In the data reported by Ye et al. [29], the rise of stimulated emission recorded in the spectral range from 800 to 950 nm is delayed by \sim 0.02 ps. Evidently, this delay is much smaller than the one described here. Since around the fluorescence maximum, there is nearly no stimulated emission in the transient absorption signal, the existence of an excited state absorbance around the fluorescence maximum was suggested [10,18,19]. As the excited state absorption may respond differently to processes occurring in the excited state than the stimulated emission (or the fluorescence), one could imagine that the spectral dynamics observed in time-resolved absorption and fluorescence experiments need not to be identical. However, in the spectral region of the stimulated emission, no (or only a small tail of this) excited-state absorbance is detected [10,11,18]. Therefore, the origin of the nearly instantaneous rise of the stimulated emission in comparison to the dynamic Stokes shift cannot be explained here on the basis of experimental results and has to remain the object of further investigation.

In the two other femtosecond fluorescence experiments on BR [15,16], no emphasis was laid on the detection of a delayed rise and it cannot be excluded that this effect was therefore missed. Here, to our knowledge, a dynamic Stokes shift is demonstrated for the first time.

In the following, we will compare this Stokes shift with predictions made by the competing models on the primary events in the photocycle of BR. These models (a very recent overview is given in Ref. [30]) can be roughly divided in two groups. The two-state models [8,9,14,30–33] claim that two electronic states—the ground state and one excited state—suffice to describe the photodynamics. In the three-state models [10,34], the potential energy surface of a second excited state comes into play, which is believed to interact with that of the primarily excited state. The first group can be further divided by the fashion in which the motions on the excited state potential surface are treated.

The simplest model is the two-state, one-mode model. Here, the only vibrational mode considered is the torsional

mode around the $C_{13}=C_{14}$ double bond, which is either treated inertially or overdamped. In the inertial case [32], the decay of the electronically excited state is fast relative to the vibrational equilibration. In the overdamped case [8,9], the wavepacket generated in the excited state is driven out of the Franck–Condon region in less than 0.2 ps by a reactive potential energy surface along a barrierless path. This movement is accompanied by at least partial vibrational relaxation in the electronically excited state. The conical intersection with the ground state is believed to be situated midway between the all-*trans* and the 13-*cis* geometry. By internal conversion within \sim 0.5 ps, the molecule relaxes to a hot electronic ground state from where it either relaxes back to the all-*trans* configuration or is fully isomerised into the J intermediate state. In this model, the J intermediate state represents the 13-*cis* electronic ground state from where the molecule relaxes into the K ground state within 3–5 ps.

In the two-mode [14,31,33] model, in addition to the low-frequency torsional coordinate, a high-frequency stretching coordinate is involved. An initial motion out of the Franck–Condon region towards a stationary point along the stretching coordinate results in a relaxation of C–C distances. The wavepacket then moves along the torsional coordinate towards a conical intersection within \sim 0.5 ps. Also, in this model, the J intermediate is said to have the 13-*cis* configuration.

The many-modes model [30] includes not only a low-frequency torsional but several higher-frequency modes as reaction coordinates. By following a reaction chain during which in each step another vibrational coordinate is excited the isomerised configuration that represents the K ground state is reached within 3.5 ps. The pathways over the C–C stretch and the HOOP (hydrogen out-of-plane) vibrational relaxation lead to the nonreactive, i.e., nonisomerising intermediates I and J in the electronically excited state. The relaxation of these intermediates to the electronic ground state occurs within 0.1–0.2 and 0.5 ps, respectively.

The three-state models [10,34] claim that due to interaction between the S_1 and the S_2 state barriers along the torsional coordinate exist. Following photoexcitation into a relatively flat Franck–Condon active region, this barrier is surmounted in \sim 0.5 ps. By passing this barrier, the J intermediate is formed, which here is considered to be an excited state species. The decay of the J intermediate partially replenishes the all-*trans* ground state and partially forms the K intermediate.

As the Franck–Condon active region in the three-state model is relatively flat and separated from a steeply sloped reactive region by a small barrier, no Stokes shift is expected to be found. Instead, an instantaneous rise of the fluorescence at all wavelengths is expected. Therefore, the dynamic Stokes shift found here does not fit into this model very well. On the other hand, the two-state overdamped model clearly requires a dynamic Stokes shift on the time scale of the motion of the wavepacket out of the Franck–

Condon active region. The two-states, two-mode model is able to provide an explanation for a dynamic Stokes shift as well. The emission dynamics for early delay times in this model depend on the initial spectral distribution and the time scale of the relaxation along the high frequency coordinate. Another possibility for the appearance of a dynamic Stokes shift could be described by models that include a branching mechanism out of the Franck–Condon active region into distinct molecular pathways. Such an approach would require several reaction coordinates instead of only a torsional one [11]. For example a bifurcation into a reactive and a nonreactive vibrational coordinate could lead to a dynamic Stokes shift on the time scale of the relaxation of the nonreactive vibration while the pathway over the reactive vibrational coordinate would lead to the formation of the isomerised configuration.

Definitely, simple inspection of the experimental data presented here does not allow one to settle the mechanisms of the primary reactions of BR. Such a decision would require an in-depth comparison of simulated data based on the various models with the experimental results. Here, we just note that fluorescence data should simplify this comparison. Contrary to absorption experiments, the excited-state absorptions need not be considered.

Prior to advancing to the high excitation density experiments, the third (picosecond-) time constant has to be discussed. The amplitude related to such a time constant has been found to be very small (<5%) compared to the other two time constants. Since the amplitude is so small, only an estimate of ~3 to 10 ps for this time constant can be given. This is in good agreement with Ref. [16]. The much higher amplitude of up to 25% reported by Ref. [15] might stem from the fact that the sample in this experiment could not be exchanged with each excitation pulse and therefore accumulation of a steady state concentration of intermediates could not be excluded.

Since a fluorescence decay time of ≥ 10 ps is found for BR molecules with a locked retinal chromophore [16,35], that component should not be assigned to the dynamics of the excited state surface of fully functional BR molecules. Instead, we suggest this remaining fluorescence to stem from inactive BR molecules in the sample, like molecules with steric hindrance.

4.2. High excitation density

By applying high-intensity ultrashort laser pulses to the sample, multi-photon and multi-step absorption processes with excitation of higher electronically excited levels can be expected (in the following, we use the term multi-photon absorption for both processes). In fact, indications of such processes in BR have been found by fluorescence [36] and transient absorption experiments [20]. Although the systems are not completely comparable, there is evidence of a saturation behaviour in the reaction centres of Photosystem II of green plants and of the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* at excitation densities above 0.5 photons per molecule [37]. This is—particularly when considering the slightly different ways of calculating the excitation densities—of the same order as the saturation behaviour found in this work.

sphaeroides at excitation densities above 0.5 photons per molecule [37]. This is—particularly when considering the slightly different ways of calculating the excitation densities—of the same order as the saturation behaviour found in this work.

The multi-photon process of lowest order to be considered is a 2-photon absorption. For the excitation at 565 nm in the experiments described here excited states in the spectral range of 280 nm are accessible. Since the 2-photon process can occur via a resonant intermediate state ($S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_n$), it is expected to be rather efficient.

With the occupation of higher excited states S_n of BR, a change in the emission dynamics should occur. One effect of this occupation should be the observation of radiative transitions between the S_n state and other electronic states. Since the S_n state is expected to decay rapidly via internal conversion, the fluorescence emission caused by these radiative transitions should be very short-lived. Nevertheless, such a process should delay the peak of the emission by some time. As the energy gap between higher excited states may be smaller than the $S_1 \rightarrow S_0$ gap, transitions among higher excited states may result in a red-shifted fluorescence emission. Indeed, with increasing excitation density, the ultrafast component (Fig. 4) gains dramatically in amplitude. Apart from the observation of a slight shift of the emission peak towards later delay times, our time resolution does not allow to separate the ultrafast component into a ‘normal’ low-intensity contribution and a high-intensity part. But the spectral signature of the high-intensity component—it is predominantly observed in the red part of the spectra—underscores the notion that this emission is due to transitions among higher electronic states.

As a second effect of the 2-photon excitation one expects an apparently increased lifetime of the S_1 state. Population transferred from the S_1 to higher excited states has to return to this state prior to its decay. Trivially, the internal conversion from the higher excited states takes time, resulting in the effectively increased lifetime. This increase is experimentally observed. By analysing the second decay component, an increase of the decay time was measured, which ranges in the excitation regime of 1 to 40 photons per molecule between 0.45 and 0.7 ps. Furthermore, the spectrum associated with this decay is not affected by the excitation density. This indicates that under all conditions, the decay of the same state, namely the S_1 , is observed. Of course, the transfer to higher excited states might open the route to other reaction channels and/or other regions of the S_1 surface might become accessible. However, such effects if present leave no spectroscopic imprint here.

Both observations can be explained by a 2-photon absorption according to our previous considerations. This leads us to the conclusion that, compared to experiments with low excitation density, the behaviour of BR is changed under high excitation density conditions by preparing BR molecules with a mixture of higher excited states.

5. Conclusion

The photoprocesses of BR have been a topic of research for over 30 years. After absorption of a photon, a reaction cycle with several intermediates (J, K, L, M, N, O) is initiated. Though the time constants associated with the transformation of these intermediates are quite accurately settled, the underlying processes particularly of the primary reaction are still under debate. Since the efficiency of these first steps is the basis for the high overall quantum yield of the BR photocycle, a profound knowledge of these processes is highly desirable. There is consensus that the primary reactions lead to a retinal chromophore isomerised around its C₁₃=C₁₄ double bond. The pathways to that isomer—the numbers of vibrational modes and even electronic states involved—are still not resolved in detail. This situation reflects the fact that the problem is very involved theoretically and experimental (mainly spectroscopic) results are often ambiguous. Most experimental information rests on transient absorption spectroscopy. Here, absorption signals of excited states render the comparison with theoretical modelling particularly challenging. Not only the potential energy surface of the state in which the photoreaction takes place has to be calculated but also those of higher electronic states. In fluorescence experiments, the demand on modelling is relaxed; only the ground and one excited state contribute to the signal. Here, for the first time, femtosecond fluorescence experiments on BR employing the Kerr technique have been presented. This technique is particularly suitable to record complete time-dependent fluorescence spectra. By carefully studying the dependence of the fluorescence signals on the excitation densities, some discrepancies found in the literature could be assigned to multi-photon effects. In the one-photon regime, for the first time, a dynamic Stokes shift, i.e., a red shift of fluorescence spectra with time, has been detected. The shift proceeds with a characteristic time of 0.2 ps and is indicative for a fast re-arrangement on the reactive surface. In agreement with other experiments, time constants of <0.15 and ~0.45 ps for the decay of the fluorescence have been determined.

Acknowledgement

We would like to thank Jörg Tittor from the Max Planck Institut für Biochemie at Martinsried for the preparation of the BR samples and Wolfgang Zinth for fruitful discussions and continuous support of this work.

References

- [1] U. Haupts, J. Tittor, D. Oesterhelt, Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28 (1999) 367–399.

- [2] H.-J. Pollard, M. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, D. Oesterhelt, Early picosecond events in the photocycle of bacteriorhodopsin, *Biophys. J.* 49 (1986) 651–662.
- [3] J. Tittor, D. Oesterhelt, The quantum yield of bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.* 263 (1990) 269–273.
- [4] M. Rohr, W. Gärtner, G. Schweitzer, A. Holzwarth, S. Braslavsky, Quantum yields of the photochromic equilibrium between bacteriorhodopsin and its bathointermediate K. Femto- and nanosecond optoacoustic spectroscopy, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 6055–6061.
- [5] S. Logunov, M. El-Sayed, L. Song, J. Lanyi, Photoisomerization quantum yield and apparent energy content of the K intermediate in the photocycles of bacteriorhodopsin, its mutants D85N, R82Q, and D212N, and deionized blue bacteriorhodopsin, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 2391–2398.
- [6] M. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, D. Oesterhelt, Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin, *Chem. Phys. Lett.* 117 (1985) 1–7.
- [7] A. Sharkov, A. Pakulev, Y. Matveetz, Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy, *BBA* 808 (1985) 94–102.
- [8] J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, D. Oesterhelt, Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* 144 (1988) 215–220.
- [9] R. Mathies, C. Cruz, W. Pollard, C. Shank, Direct observation of the femtosecond excited-state *cis*–*trans* isomerisation in bacteriorhodopsin, *Science* 240 (1988) 777–779.
- [10] K. Hasson, F. Gai, P. Anfinrud, The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: experimental evidence for a three-state model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 15124–15129.
- [11] T. Ye, N. Friedman, Y. Gat, G. Atkinson, M. Sheves, M. Ottolenghi, S. Ruhman, On the nature of the primary light-induced events in bacteriorhodopsin: ultrafast spectroscopy of native and c₁₃=c₁₄ locked pigments, *J. Phys. Chem., B* 103 (1999) 5122–5130.
- [12] B. Hou, N. Friedman, S. Ruhman, M. Sheves, M. Ottolenghi, Ultrafast spectroscopy of the protonated Schiff bases of free and C₁₃=C₁₄ locked retinals, *J. Phys. Chem., B* 105 (2001) 7042–7048.
- [13] S. Dexheimer, Q. Wang, L. Peteanu, W. Pollard, R. Mathies, C. Shank, Femtosecond impulsive excitation of nonstationary vibrational states in bacteriorhodopsin, *Chem. Phys. Lett.* 188 (1992) 61–66.
- [14] W. Zinth, A. Sieg, P. Huppmann, T. Blankenhorn, D. Oesterhelt, M. Nonella, Femtosecond spectroscopy and model calculations for an understanding of the primary reaction in bacteriorhodopsin, *Ultrafast Phenomena XII*, Springer Ser. Chem. Phys., vol. 66, 2000, pp. 680–682.
- [15] M. Du, G. Fleming, Femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy of bacteriorhodopsin: direct observation of excited state dynamics in the primary step of the proton pump cycle, *Biophys. Chemist.* 48 (1993) 101–111.
- [16] S. Haacke, S. Schenkl, S. Vinzani, M. Chergui, Femtosecond and picosecond fluorescence of native bacteriorhodopsin and a nonisomerizing analog, *Biopolymers (Biospectroscopy)* 67 (2002) 306–309.
- [17] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, P. Gilch, A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy, *Appl. Phys., B* 76 (2003) 809–814.
- [18] G. Haran, K. Wynne, A. Xie, Q. He, M. Chance, R.M. Hochstrasser, Excited state dynamics of bacteriorhodopsin revealed by transient stimulated emission spectra, *Chem. Phys. Lett.* 261 (1996) 389–395.
- [19] F. Gai, J. McDonald, P. Anfinrud, Pump-dump-probe spectroscopy of bacteriorhodopsin: evidence for a near-IR excited state absorbance, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 6201–6202.
- [20] S.L. Logunov, V.V. Volkov, M. Braun, M.A. El-Sayed, The relaxation dynamics of the excited electronic states of retinal in bacteriorhodopsin by two-pump-probe femtosecond studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8475–8479.
- [21] D. Oesterhelt, W. Stoerkenius, Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane, *Methods Enzymol.* 31 (1974) 667–678.

- [22] M.L. Horng, J.A. Gardecki, A. Papazyan, M. Maroncelli, Subpicosecond measurements of polar solvation dynamics: coumarin 153 revisited, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 17311–17337.
- [23] M. Glasbeek, H. Zhang, Femtosecond studies of solvation and intramolecular configurational dynamics of fluorophores in liquid solution, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1929–1954.
- [24] D. Abramavicius, V. Gulbinas, L. Valkunas, Y.-J. Shiu, K. Liang, M. Hayashi, S. Lin, Molecular twisting and relaxation in the excited state of triarylpyrylium cations, *J. Phys. Chem., A* 106 (2002) 8864–8869.
- [25] Y.-C. Lu, C. Chang, E.W.-G. Diau, Femtosecond fluorescence dynamics of *trans*-azobenzene in hexane on excitation to the $S_1(n,\pi^*)$ state, *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)* 49 (2002) 693–701.
- [26] B. Schmidt, C. Sobotta, S. Malkmus, S. Laimgruber, M. Braun, W. Zinth, P. Gilch, Femtosecond fluorescence and absorption dynamics of an azobenzene with a strong push–pull substitution, *J. Phys. Chem., A* 108 (2004) 4399–4404.
- [27] S. Kovalenko, R. Schanz, V. Farztdinov, H. Hennig, N. Ernsting, Femtosecond relaxation of photoexcited *para*-nitroaniline: solvation, charge transfer, internal conversion and cooling, *Chem. Phys. Lett.* 323 (2000) 312–322.
- [28] D. Markovitsi, H. Sigal, C. Ecoffet, P. Millie, F. Charra, C. Fiorini, J.-M. Nunzi, H. Strzelecka, M. Veber, C. Jallabert, Charge transfer in triaryl pyrylium cations. Theoretical and experimental study, *Chem. Phys.* 182 (1994) 69–80.
- [29] T. Ye, B. Hou, E. Gershgoren, M. Ottolenghi, N. Friedman, M. Sheves, S. Ruhman, Resolving the primary dynamics of bacteriorhodopsin, and Locked analogs in the reactive excited state, *Ultrafast Phenomena XII*, Springer Ser. Chem. Phys., vol. 66, 2000, pp. 683–685.
- [30] H. Abramczyk, Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin and its retinal modified analogs: revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 11120–11132.
- [31] M. Garavelli, F. Negri, M. Olivucci, Initial excited-state relaxation of the isolated 11-*cis* protonated schiff base of retinal: evidence for in-plane motion from ab initio quantum chemical simulation of the resonance Raman spectrum, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 1023–1029.
- [32] R. Birge, Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta* 1016 (1990) 293–327.
- [33] R. Gonzalez-Luque, M. Garavelli, F. Bernardi, M. Merchan, M. Robb, M. Olivucci, Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9379–9384.
- [34] F. Gai, K. Hasson, J. McDonald, P. Anfinrud, Chemical dynamics in proteins: the photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin, *Science* 279 (1998) 1886–1891.
- [35] S. Haacke, S. Vinzani, S. Schenkl, M. Chergui, Spectral and kinetic fluorescence properties of native and nonisomerizing retinal in bacteriorhodopsin, *Chem. Phys. Chem.* 2 (2001) 310–315.
- [36] H. Polland, M. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, D. Oesterhelt, Energy transfer from retinal to amino acids—a time-resolved study of the ultraviolet emission of bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta* 851 (1986) 407–415.
- [37] M.-L. Groot, R. van Grondelle, J.-A. Leegwater, F. van Mourik, Radical pair quantum yield in reaction centers of photosystem II of green plants and of the bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. Saturation behavior with sub-picosecond pulses, *J. Phys. Chem., B* 101 (1997) 7869–7873.