Photon-Echo-Spektroskopie zur Dynamik der Solvation in Wasser und an Lipidmembran-Wasser-Grenzschichten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Helge Bürsing
aus Gifhorn

Göttingen 2002

D7

Referent: Prof. Dr. Jürgen Troe

Korreferent: Prof. Dr. Michael Buback

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 2002

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
3	Phospholipidmembrane	9
3.1	Phospholipide: Chemische Struktur	9
3.2	Lipiddoppelschicht (Membran)	11
3.3	Eigenschaften von Phospholipidmembranen: Vesikel.....	13
3.3.1	Phasenverhalten von Phospholipiddoppelschichten	13
3.3.2	Kristalline Phase L_c	15
3.3.3	Gelförmige Phase $L_{\beta'}$	16
3.3.4	Zackige Phase $P_{\beta'}$ („ripple phase“)	17
3.3.5	Flüssig-kristalline Phase L_{α}	18
3.3.6	Hydratisierung	19
3.3.7	Molekulardynamik-Simulationen	20
3.3.8	Kommentar zu den Eigenschaften der Lipiddoppelschicht.....	21
4	Theoretische Grundlagen.....	22
4.1	Elektronisches 2-Niveau-System in der Bloch'schen Beschreibung.....	26
4.2	Stochastische Theorie zur Resonanzbreite nach Kubo.....	33
4.3	Störungstheoretische Beschreibung von Vier-Wellen-Mischen (4WM)	38
4.4	Das Modell der Brown'schen Oszillatoren.....	43
4.5	Drei-Puls-Echo-Spektroskopie	46
4.6	Transiente Gitter Spektroskopie.....	50

5	Experimenteller Teil	53
5.1	Lasersystem	53
5.1.1	Regenerativer Verstärker	53
5.1.2	Nichtkollinearer optisch-parametrischer Verstärker	54
5.1.2.1	Theorie der parametrischen Verstärkung im NOPA	54
5.1.2.2	Aufbau des NOPA	58
5.2	Messaufbau	61
5.2.1	Aufbau der Dreiecksgeometrie	61
5.2.2	Aufbau der Boxchargeometrie	63
5.2.3	Vergleich zwischen Dreiecks- und Boxchargeometrie	65
5.3	Experimentsteuerung und Detektion der Signale	66
5.4	Temperaturstabilität im Experiment	68
5.4.1	Rotationszelle	68
5.4.2	Untersuchung der Erwärmung der Probe im Experiment	69
5.5	Farbstoffsynthese	70
5.6	Probenmoleküle und Vesikelpräparation	72
5.6.1	Farbstoffe	72
5.6.2	Lipide	73
5.6.3	Vesikelherstellung	74
6	Ergebnisse und Diskussion	76
6.1	Allgemeine Untersuchungen der Farbstoffe und der Lipidlösungen	77
6.2	Zwei-Puls-Echo-Messungen (2-PE)	89
6.3	Drei-Puls-Echo-Peakshift-Messungen (3-PEPS) von DiDC ₁ in Wasser	91
6.3.1	Analyse der Solvatationskorrelationsfunktion	
	des Wassers bei Zimmertemperatur	91
6.3.2	Temperaturabhängigkeit der Solvation von DiDC ₁ in Wasser	102

6.4	Drei-Puls-Echo-Peakshift-Messungen von DiDC ₁₈	
	an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht.	107
6.4.1	Analyse der Solvatationsdynamiken an der	
	Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht im Vergleich zum Wasser.....	107
6.4.2	Diskussion der gemessenen Solvatationsdynamik	
	in Bezug zu Arbeiten aus der Literatur	110
6.4.3	Temperaturabhängigkeit der Solvatationsdynamik	
	an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht.....	115
6.4.3.1	Temperaturabhängigkeit der Solvatationsdynamik	
	an der DMPC-Wasser-Grenzschicht.....	116
6.4.3.2	Temperaturabhängigkeit der Solvatationsdynamik	
	an der DOPC-Wasser-Grenzschicht	119
6.4.3.3	Temperaturabhängigkeit der Solvatationsdynamik	
	an der DPPC-Wasser-Grenzschicht	120
7	Ausblick.....	126
8	Anhang	131
9	Literaturverzeichnis.....	135

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen zur ultraschnellen Solvation an wässrigen Grenzschichten von synthetischen Phospholipid-Membranen. Als experimentelle Technik, die in solchen Systemen erstmalig zum Einsatz kommt, dient die Photon-Echo-Spektroskopie. Als Sonde für dynamische Solvation wird ein Indocarbocyanin-Farbstoff, der nicht-kovalent in der Phospholipid-Membran verankert ist und dessen optischer Chromophor an der Grenzschicht Wasser/Lipid lokalisiert ist, verwendet.

Komplementäre Untersuchungen zur Solvationsdynamik desselben Chromophors in wässrigen Volumenphasen erlauben die eindeutige Identifizierung von grenzschicht-spezifischen Phänomenen.

Die Dynamik der Solvation in wässrigen Volumenphasen bei Zimmertemperatur erfolgt im wesentlichen auf zwei Zeitskalen:

- a.) unterhalb von etwa 1 ps beobachtet man die Relaxation kollektiver, gehinderter Translationsmoden, die für das zufällige ungestörte Wasserstoffbrücken-Netzwerk der reinen Flüssigkeit typisch sind,
- b.) oberhalb von etwa 1 ps ist die Solvation dominiert durch die diffusive Reorientierungsdynamik der Wassermoleküle in der Umgebung des Chromophors.

Die Dynamik der Solvation an wässrigen Grenzschichten synthetischer Phospholipid-Membranen erfolgt dagegen bei Zimmertemperatur nur auf einer Zeitskala von mehreren Pikosekunden. Ein detaillierter Vergleich zwischen grenzschicht-spezifischer Solvation und Volumenphasen-Solvation legt nahe, dass das für reines Wasser charakteristische Wasserstoff-Brückennetzwerk an der Oberfläche von wässrigen Phospholipid-Membranen aufgebrochen ist.

Begleitende temperaturabhängige Studien zur dynamischen Solvation ermöglichen den komplexen Polymorphismus synthetischer Membranen erstmalig mit ultraschnellen Strukturrelaxationen an deren Grenzschichten in Verbindung zu bringen: Im Gegensatz zum Hauptphasenübergang (zackig-gelförmig $\leftrightarrow$ flüssig-kristallin) der mit Unordnungsphänomenen im hydrophoben Inneren solcher Membranen verknüpft ist, beeinflusst der Vorphasenübergang (zackig-gelförmig $\leftrightarrow$ gelförmig) die Solvation gerade auf Zeitskalen unterhalb 1 ps. Ein solcher Befund ist ein eindeutiger Beleg für strukturelle Änderungen in der Grenzschichtregion, die den thermodynamischen Vorphasenübergang begleiten und ist konsistent mit einer Dehydratisierung der Grenzfläche beim Übergang von der zackig-gelförmigen Phase zur gelförmigen Phase.

2 EINLEITUNG

Phospholipid-Membranen stellen ein wichtiges Strukturelement in biologischen Systemen dar. Ihre primäre Funktion ist die räumliche Trennung von Zelle oder Zellorganellen und deren Umgebungen. Sie sind darüber hinaus die ideale Matrix für eine Vielzahl von Proteinen, die ihrerseits für die Funktion von Zellen bzw. Organellen verantwortlich sind. Bestimmte, in die Membran eingebettete Proteine übernehmen unter anderem die Aufgabe des Stofftransportes und damit den Austausch von Informationen zwischen Zellen oder deren Kompartementen. Von essentieller Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch der Ladungstransport (also Transport spezifischer Ionen) über biologische Grenzschichten. Prototypisch für einen solchen Ladungstransport ist beispielsweise die lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin, die in Purpurmembranen von Halobakterien gefunden werden. Die primäre Absorption von Licht durch den proteineigenen Chromophor Retinal wird dazu genutzt, einen transmembranen Protonengradienten aufzubauen. Letzterer dient schließlich dazu, um in einem zweiten Membranprotein, der sogenannten ATP-Synthase, chemische Energie in Form von ATP bereitzustellen und damit die Energie des primär absorbierten Photons für die Zelle nutzbar zu machen.

Der Grenzschicht Membran-Wasser kommt beim Transport geladener oder auch dipolarer Spezies eine ganz besondere Bedeutung zu. Wassermoleküle, die an der Grenzschicht lokalisiert sind, übernehmen den Aufbau einer Hydrathülle der transportierten Spezies und ermöglichen erst deren Austritt aus der Protein-Membran-Einheit über die Grenzschicht hinweg und hinein in die wässrige Volumenphase weit oberhalb der Lipiddoppelschicht.

Der Aufbau einer solchen Hydrathülle ist schwer im Experiment zu verfolgen. Es ist aber möglich, stellvertretend für den Transport eines geladenen oder dipolaren Teilchens über die Membran, die Ladungsdichteverteilung eines unmittelbar an der Grenzschicht lokalisierten Sondenmoleküls zu verändern. So kann durch Absorption eines ultrakurzen Lichtimpulses die räumliche Lage bzw. die Größe des Dipolmoments eines solchen Sondenmoleküls extrem schnell geschaltet werden. Die Moleküle in der Umgebung der Sondenmoleküle stabilisieren daraufhin die neue Ladungsdichteverteilung durch Umorientierung ihrer eigenen Dipole. Damit ein solches Experiment gelingt, muß die Ladungsdichteänderung im Sondenmolekül schneller erfolgen als die Reorientierungsdynamik in der Umgebung.

Experimentell kann die Dynamik der Stabilisierung einer „instantan“ erzeugten Ladungsdichtestörung verfolgt werden, indem das zeitabhängige Emissionsspektrum der Sondenmoleküle aufgezeichnet wird. Die Stabilisierung geht mit einer Verschiebung der Sondenfluoreszenz zu niedrigeren Frequenzen einher. Daher werden solche Experimente auch zeitaufgelöste Stokes-Verschiebung (oder „time-dependent fluorescence Stokes shift“, TDFSS) genannt.

TDFSS-Experimente sind Grundlage einer Vielzahl von Arbeiten zur dynamischen Solvation in molekularen Flüssigkeiten. Zur Solvationsdynamik an Phospholipid-Membranen gibt es zur Zeit kaum experimentelle Befunde. Es existieren TDFSS-Experimente von M. Hof und Mitarbeitern zur dynamischen Solvation auf Nanosekundenzeitskalen [1, 2]. Analoge Studien zur Solvation in inneren Wassereinschlüssen von Phospholipid-Vesikeln sowie inversen Mizellen wurden von Bhattacharyya [3-9] bzw. Lvinger und Mitarbeitern [10-12] berichtet. Zur grenzschicht-spezifischen Solvation an Lipidmembranen gibt es bislang weder experimentelle noch theoretische (z.B. auf Basis von MD-Simulationen) Befunde.

Die vorliegende Arbeit ist folgendermaßen gegliedert: Kapitel 3 beschreibt zunächst die für die Experimente wichtigsten chemischen und physikalischen Eigenschaften der Phospholipidmembranen. Ein großer Teil dieses Abschnitts liefert die Diskussionsgrundlage für die gewonnenen experimentellen Ergebnisse. Die theoretischen Grundlagen der hier durchgeführten Experimente werden in Kapitel 4 erörtert. Ein besonderer Wert ist in diesem Kapitel auf die Modelle zur Beschreibung von Solvationsprozessen gelegt. Außerdem wird der mathematische Zusammenhang zwischen der in den Experimenten bestimmten 3-Puls-Echo-Peakshift-Funktion und der Solvationskorrelationsfunktion dargestellt. In Kapitel 5 werden das verwendete Lasersystem und der experimentelle Aufbau beschrieben. Anschließend werden die Ergebnisse vorgestellt und diskutiert.

3 PHOSPHOLIPIDMEMBRANE

Im folgenden Kapitel werden Membrane, die aus Phospholipiden aufgebaut sind, vorgestellt. Zum grundlegenden Verständnis der Membranen wird im ersten Teil die chemische Struktur der Phospholipide erklärt. Diese Struktur bedingt die physikalischen Eigenschaften und damit die Ausrichtung der einzelnen Moleküle in den Membranen. Im zweiten Teil wird die spontane Ausbildung von Lipiddoppelschichten (Membranen) dargestellt, bevor im dritten Teil die in der Literatur bekannten Eigenschaften dieser Membranen diskutiert werden.

3.1 Phospholipide: Chemische Struktur

Lipide sind amphiphile Moleküle mit einer polaren Kopfgruppe, an die unpolare Kohlenwasserstoffketten gebunden sind [13].

Abbildung 3.1: Unterteilung von Lipiden am Beispiel von DPPC; Kohlenstoff = grün; Wasserstoff = grau; Sauerstoff = rot; Phosphor = violett; Stickstoff = blau.

Die **Kopfgruppen** unterscheiden sich in ihrer Größe und ihrer Polarität. Es gibt neutrale, einfach geladene und mehrfach geladene Kopfgruppen. Neutrale Lipidkopfgruppen kommen in der Natur nicht vor und sind daher nur synthetisch zugänglich.

Die Größe der Kopfgruppe wird durch die an sie gebundenen Substituenten bestimmt. Die natürlichen Phospholipide unterteilen sich hierbei in zwei Hauptgruppen, den Glycerophospholipiden (siehe Abbildung 3.2) und den Sphingophospholipiden [13]. Diese Phospholipide dominieren den Bereich der biologischen Membranen (Lipiddoppelschichten). In den folgenden Abschnitten wird lediglich auf die Glycerophospholipide eingegangen, da diese die in der Arbeit untersuchten Lipide darstellen.

Abbildung 3.2: Allgemeine Strukturformel der Glycerophospholipide

Zu den wichtigsten Kopfgruppen der Glycerophospholipide zählen die Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerole, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserine. Die Kopfgruppen werden häufig durch an sie gebundene Moleküle modifiziert. Für spektroskopische Untersuchungen können z.B. Farbstoffe gezielt durch eine kovalente Bindung mit der Kopfgruppe verbunden werden [10].

Die **Kettenregion** (Abbildung 3.1) besteht aus aliphatischen Kohlenwasserstoffketten, die bei den natürlichen Lipiden von den natürlich vorkommenden Carbonsäuren abstammen. Die Lipide besitzen je nach Kopfgruppe eine bzw. zwei Kohlenstoffketten. Diese Ketten kommen in verschiedenen Längen vor und können sich im Sättigungsgrad unterscheiden. Da R_1 und R_2 (siehe Abbildung 3.2) unterschiedlich sein können, gibt es eine große Vielfalt von Lipiden.

3.2 Lipiddoppelschicht (Membran)

Die Kombination aus polarer Kopfgruppe und unpolarer Kette verursacht die für Lipide typischen Eigenschaften. Die polare Kopfgruppe bevorzugt polare Umgebungen, während die unpolare Kette unpolare Bereiche vorzieht. Dieser amphiphile Charakter bewirkt, dass die Lipide in reiner Form multilamellare Doppelschichten ausbilden [13]. Eine Schicht von Kopfgruppen wird in diesem Fall gefolgt von einer Schicht unpolarer Ketten. An diese schließt sich wieder eine Kopfgruppenschicht an, usw. . Diese Schichten bleiben im Wasser über lange Zeit stabil. Durch geeignete Bedingungen und Methoden lassen sich diese Strukturen aufbrechen und neue Strukturen entstehen. In Abbildung 3.3 sind drei dieser Strukturen gezeigt. Neben den abgebildeten Strukturen gibt es z.B. die bereits erwähnten multilamellaren Schichten. Die Eigenschaften der Kopfgruppe und die Form der Kette bestimmen, welche Struktur sich spontan ausbildet. Schon kleine chemische Unterschiede (z.B. im Sättigungsgrad; zwei gleiche Ketten im Gegensatz zu zwei unterschiedlichen Ketten) in den Lipiden verändern die Strukturen und die thermodynamischen Eigenschaften entscheidend.

Abbildung 3.3: Strukturen von Lipiden in Lösung [13]

Eine Möglichkeit die Struktur der multilamellaren Schichten aufzubrechen ist das Zusetzen von Lösungsmitteln. Bei der Zugabe von einem unpolaren Lösungsmittel (z.B. Alkane), wird dieses Lösungsmittel im Bereich der unpolaren Ketten eingelagert. Im Gegensatz dazu brechen polare Lösungsmittel (z.B. Wasser) die Schichten an den Kopfgruppen auf. Die so entstandenen Doppelschichten zeigen mit den polaren Kopfgruppen nach außen in das Wasser. Es entstehen auf diese Weise

auch Wassereinschlüsse. Dies sind Bereiche von Wasser, die durch die Membranschichten vom restlichen Wasser abgeschirmt sind (siehe Vesikel in Abbildung 3.3).

Um die individuellen, mesoskopischen Strukturen auf ihre speziellen Eigenschaften hin zu untersuchen, wurden in der Vergangenheit Verfahren zu ihrer gezielten Herstellung entwickelt. Zur Präparation von Vesikeln gibt es eine Vielzahl von Methoden, die spezielle Größen und Größenverteilungen erzeugen. Vesikel werden auf Grund ihrer Größe und der Anzahl der Schichten eingeteilt. Es wird unterschieden in unilamellare und multilamellare Vesikel. Die Grobeinteilung der Größe von unilamellaren Vesikeln beschränkt sich auf kleine („small unilamellar vesicles“, SUV), große („large unilamellar vesicles“, LUV) und sehr große („giant vesicles“, gigantische Vesikel) Vesikel. Während die SUVs eine Größe von weniger als 100 nm besitzen, und LUVs größer als 100 nm sind, erreichen gigantische Vesikel eine Größe von 20 µm bis 100 µm.

Zur Herstellung von gigantischen Vesikeln wird z.B. eine Elektroformationsmethode angewandt [14, 15]. Eine recht alte Methode ist die Ultraschallpräparation von Vesikeln. Die dadurch entstehenden Vesikel haben eine breite Größenverteilung. Die Dauer der Ultraschallbestrahlung bestimmt maßgeblich, inwieweit die zunächst großen multilamellaren Vesikel zerbrechen und sich kleinere Vesikel bilden. SUV werden auf diese Weise durch langes Einwirken von Ultraschallstrahlung auf die Lösung hergestellt.

Vesikel mit einer schmalen Größenverteilung werden dagegen mittels Extrudieren durch kleinporige Filter hergestellt. Bei diesem Verfahren bestimmt die Größe der Poren in einem Polycarbonatfilter und der angewandte Druck auf die Lösung [16] die mittlere Größe der Vesikel. Diese Methode wurde bei den Experimenten in der vorliegenden Arbeit angewandt. Die Lösungen wurden durch einen 100 nm Filter extrudiert und zeichneten sich durch eine Größenverteilung mit einer Halbwertsbreite von ca. 20 nm aus. Das Maximum dieser Verteilung lag bei ca. 80 nm [17].

3.3 Eigenschaften von Phospholipidmembranen:

Vesikel

Im nun folgenden Abschnitt werden die bekannten Eigenschaften von Lipiddoppelschichten vorgestellt. Dabei werden insbesondere die speziellen Eigenschaften der unilamellaren Vesikel, die in den Experimenten eingesetzt werden, hervorgehoben. Es werden jedoch auch Untersuchungen von multilamellaren Schichten berücksichtigt.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Phospholipidmembranen sind von Bedeutung für biologische Prozesse, wie zum Beispiel dem Ionentransport [18, 19] durch eine Lipidmembran. In der Vergangenheit sind daher viele Arbeiten publiziert worden, in denen diese komplexen Systeme mittels unterschiedlichster Methoden untersucht wurden. Auf den folgenden Seiten wird nur ein Überblick über die für die durchgeführten Experimente wesentlichen Erkenntnisse gegeben. Eine ausführlichere Beschreibung ist den angegebenen Literaturstellen zu entnehmen.

3.3.1 Phasenverhalten von Phospholipiddoppelschichten

Phospholipiddoppelschichten besitzen ein einzigartiges und hochkomplexes thermodynamisches Phasenverhalten. Zur Aufklärung des Polymorphismus wurden Untersuchungen an reinen Lipiden in Form von Langmuir-Blodgett-Filmen an Lipid/Wasser - Gemischen und an Lipid/Lipid/Wasser – Gemischen durchgeführt [9, 10]. Auch der Einfluss von Fremdmolekülen wie z.B. Cholesterol [22-25] oder Melittin [26] auf den Polymorphismus von Lipiden sind gerade bezüglich biologischer Membrane von Interesse.

Es wurden vier Phasen beobachtet. Die Phasenübergänge zwischen diesen vier Phasen sind durch Messungen der Wärmekapazität sowohl in unilamellaren Vesikeln, als auch in multilamellaren Schichten zu beobachten. Die unterschiedlichen thermodynamischen Phasen variieren in der mikroskopischen Anordnung der Lipide innerhalb der Doppelschicht (siehe Abbildung 3.4).

Abbildung 3.4: Strukturen der verschiedenen Lipidphasen

Die Lipidphasen werden nach einer **Nomenklatur** von Tardieu, Luzzati und Reman [27] benannt. Die Großbuchstaben bezeichnen die weitreichende Ordnung (1-D, 2-D, 3-D Gitter). Der Buchstabe L steht für eindimensional lamellares, P für ein zweidimensional zentriertes und C für ein dreidimensional kristallines Gitter. Die griechischen Indizes beschreiben die Ordnung in den Lipidketten. α deutet eine mit Flüssigkeiten vergleichbare Ordnung an, während β und β' für teilweise geordnete Ketten stehen. Das Apostroph bezieht sich auf einen Kettenwinkel von ungleich 0° (siehe Abbildung 3.1). Ein eindimensional lamellares Gitter bedeutet in Abbildung 3.4, dass die Lipidkopfgruppen in einer Linie angeordnet sind, während im zweidimensional zentrierten Gitter die Kopfgruppen abweichend von der Linie in eine weitere Dimension hineinragen und z.B. eine Zickzackanordnung ($P_{\beta'}$) einnehmen.

Im Folgenden werden die einzelnen Strukturmerkmale und Eigenschaften der Phasen herausgearbeitet und anschließend einige Theorien vorgestellt. Eine Zusammenfassung über die Ausrichtung der Lipide findet sich in Referenz [28]. In Abbildung 3.4 sind die vorgestellten Lipidphasen schematisch mit der zugehörigen Nomenklatur gezeichnet.

Abbildung 3.5: Bezeichnungen der Konformationen der Kohlenstoffketten: Die Aufsicht auf eine Bindung der Kette ist aufgezeichnet. Die Reste R_1 (vorne) und R_2 (hinten) sind die Teile der Kette, die an die betrachtete Bindung anschließen.

3.3.2 Kristalline Phase L_c

Die kristalline Phase L_c ist stabil im unteren Temperaturbereich. Auf Grund der langsamen Umwandlung [29] der gelförmigen Phase $L_{\beta'}$ in die kristalline Phase L_c (Umwandlung erfolgt innerhalb Tagen, Wochen oder Monaten) und damit langwierigen Präparation wurde sie erst 1980 von Chen erstmals beobachtet [30]. Seit ihrer Entdeckung kann diese Phase trotz weiterer Wärmekapazitätsmessungen und Röntgenbeugungsexperimenten nur unvollständig beschrieben werden [31, 32]. So ist nicht geklärt, ob die bis heute in multilamellaren Schichten beobachtete Phase auch in unilamellaren Vesikeln vorhanden ist. Die Bezeichnung „ L_c “ beinhaltet das bislang unvollständige Wissen, denn L steht für eine eindimensionale Ordnung, während das hier inkonsequenter Weise als Index verwendete große C in der oben vorgestellten Nomenklatur eine dreidimensionale kristalline Ordnung bezeichnet. Neue Experimente von Utoh und Okubo [33] weisen auf eine schnellere Präparation dieser Phase hin. Die kristalline Phase konnte bei diesen Experimenten mit L - α -Dibehenoyl-Phosphatidylcholine (DBPC; Kohlenstoffkette mit $C_n = 22$) direkt hergestellt werden, ohne die Probe für lange Zeit bei tiefen Temperaturen zu lagern.

Die bisherigen Experimente lassen folgende Beschreibung der kristallinen Phase zu:

- 1.) Die Phase besitzt eine höhere Ordnung der Ketten als die der $L_{\beta'}$ Phase [34].
Alle Bindungen der Ketten sind in *trans*-Konformation (Abbildung 3.5).
- 2.) Die von einer Kette beanspruchte Fläche ist im Vergleich zu den übrigen drei Phasen am geringsten [35].
- 3.) Ohne ein eindeutiges Experiment wird angenommen, dass es sich um eine orthorhombische Kristallgitteranordnung handelt, während von anderen Arbeitsgruppen eine trikline Anordnung postuliert wird [35].
- 4.) Rotationen, die mit ^1H -NMR-Spektroskopie messbar sind, sind im Vergleich zur gelförmigen Phase eingefroren. Hierzu gehört sowohl die Torsion der C-C-Bindungen als auch die Rotation der Cholin-Kopfgruppe. Einzig die Rotation der $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe ist weiterhin zu beobachten [36].

Eine Erwärmung der kristallinen Phase L_c führt je nach Kettenlänge zu einer Umwandlung in die gelförmige Phase $L_{\beta'}$ oder einer direkten Umwandlung in die zackige Phase $P_{\beta'}$ bzw. in die flüssig-kristalline Phase L_{α} . Erneutes Abkühlen der Lipide aus der flüssig-kristallinen Phase L_{α} präpariert jedoch zunächst die $P_{\beta'}$ und $L_{\beta'}$ Phase, bevor sich die L_c -Phase nach längerem Warten bildet. Der Phasenübergang von der kristallinen Phase L_c in die gelförmige Phase $L_{\beta'}$ wird auch unterer Phasenübergang („subtransition“) genannt. Untersuchungen des Übergangs haben gezeigt, dass sich die kristalline Phase L_c aus der metastabilen Phase $L_{\beta'}$ bildet. Die Lipide durchlaufen hierbei mehrere metastabile Zustände. Die hierfür benötigte Zeit variiert je nach Kettenlänge und ist bislang nicht genau charakterisiert [31]. Ähnlich wie der Vorphasenübergang ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) wird der untere Phasenübergang mit einer Umorientierung der Kopfgruppen in Zusammenhang gebracht.

3.3.3 Gelförmige Phase $L_{\beta'}$

Die gelförmige Phase ist nach der flüssig-kristallinen Phase L_{α} die am längsten bekannte Phase. Die Lipidketten sind in dieser Phase vollständig gestreckt, d.h. in einer *all-trans*-Konformation [37]. Die gelförmige Phase unterscheidet sich von der kristallinen Phase durch eine Rotationsunordnung, d.h. die Lipidketten sind in Bezug auf ihre Orientierung zueinander nicht vollständig geordnet. Einige Lipide bevorzugen die L_{β} -Phase, in welcher der Kettenwinkel ϕ gleich 0° ist. Die meisten Lipide ordnen

ihre Ketten jedoch in einem Winkel ϕ ungleich 0° an [27]. Diese Lipide in der $L_{\beta'}$ -Phase besitzen auch eine im Vergleich zur L_{β} -Phase stärker hydratisierte Kopfgruppe (Abbildung 3.4). Die bevorzugte Anordnung scheint somit kopfgruppenspezifisch zu sein.

Die Gitterstruktur der aliphatischen Ketten ändert sich bei Erniedrigung der Temperatur von zunächst quasi-hexagonal in der Nähe des Vorphasenübergangs zu orthorombisch [38]. Es existieren trotz dieser Gitteranordnung noch gehinderte Kettenbewegungen mit Korrelationszeiten von 10^{-5} - 10^{-7} s wie NMR-Messungen [39] und STESR - Experimente [40] gezeigt haben. Die von einer Kette beanspruchte Fläche nimmt im Vergleich zur kristallinen Phase nur minimal zu [34].

Eine Erwärmung der gelförmigen Phase führt in Abhängigkeit von der Kettenlänge zu einem Phasenübergang in die zackige $P_{\beta'}$ -Phase bzw. in die flüssig-kristalline Phase L_{α} . Die Temperaturdifferenz zwischen Vorphasenübergang ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) und Hauptphasenübergang ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) bei Phosphocholinlipiden mit gesättigten, aliphatischen Ketten reduziert sich kontinuierlich von $\Delta T = 12^\circ$ bei DMPC (gesättigte C_{14} -Ketten als aliphatische Reste) bis zu einem Verschmelzen der beiden Übergänge zu einem Übergang bei einer Kettenlänge von 24 Kohlenstoffatomen [41, 42].

3.3.4 Zackige Phase $P_{\beta'}$ („ripple phase“)

In neuerer Zeit wurden viele Experimente zur Erforschung dieser Phase durchgeführt, da sie auf Grund ihrer besonderen Struktur für das allgemeine Verständnis von Lipiddoppelschichten von Bedeutung ist. Röntgenbeugungsexperimente von Shipley und Mitarbeitern [34, 35, 43, 44] an multilamellaren Schichten weisen bei kleinem Beobachtungswinkel zusätzliche Beugungslinien auf, die auf ein zweidimensionales Gitter hindeuten. Trotz gegensätzlicher Beobachtungen [45] können spätere elektronenmikroskopische Aufnahmen von eingefrorenen Schichten der $P_{\beta'}$ -Phase dies belegen [46, 47]. Die beobachteten Zacken („ripple“) bilden sich in Abhängigkeit vom Wassergehalt. Die räumliche Periode der Zacken ändert sich bei Phosphocholinen von 164 Å bis zu 145 Å mit steigendem Wassergehalt [48].

Ein weiterer Diskussionspunkt bei der Struktur dieser Phase war in der Vergangenheit der Kettenwinkel ϕ . Während die ursprüngliche Analyse von Tardieu [27] einen Kettenwinkel ungleich 0° vermuten lässt, haben Rand und Mitarbeiter [49] in Röntgenbeugungsexperimenten einen Übergang von gewinkelten

zu nicht gewinkelten Ketten ermittelt. Neueste Ergebnisse der Infrarotspektroskopie von Le Bihan [50] belegen jedoch nur eine minimale Abnahme des Kettenwinkels von 28° in der gelförmigen Phase zu 24° in der zackigen Phase bei DPPC Lipiden.

Die Ketten nehmen in dieser Phase eine *all-trans*-Geometrie mit einer leichten Zunahme der *gauche*-Konformation im Vergleich zur gelförmigen Phase $L_{\beta'}$ ein (Abbildung 3.5). Im Mittel werden je Kette ein bis zwei *gauche*-Konformationen beobachtet [38, 51, 52].

Der Übergang von $L_{\beta'}$ nach $P_{\beta'}$ ist nach heutigem Stand von einer Neuordnung der Lipidkopfgruppen und nur in geringem Maße von einer Neuordnung der Ketten bestimmt. So ist die Umwandlungsenthalpie unabhängig von der Kettenlänge [13]. Die Volumenzunahme der Doppelschicht am Übergang ist für Kettenlängen von 13 bis 20 Kohlenstoffatomen konstant [53]. Einzig der Wassergehalt und die Aktivität des Wasser, haben einen Einfluss auf die Lage und die Enthalpie des Überganges. Es wird kein Übergang für Lipide bei einem Wassergehalt von weniger als 20 Gewichtsprozent beobachtet [44]. In diesem Fall wird die gelförmige Phase $L_{\beta'}$ direkt in die flüssig-kristalline Phase L_{α} umgewandelt.

3.3.5 Flüssig-kristalline Phase L_{α}

Die flüssig-kristalline Phase ist für die Biologie von Bedeutung, da sie im physiologisch relevanten Temperaturbereich thermodynamisch stabil ist. Sie ist aus diesem Grund auch am gründlichsten untersucht.

Röntgenbeugungsexperimente haben eine hexagonale Gitterstruktur aufgezeigt [35]. Die Ketten zeigen in dieser Phase eine starke Zunahme der *gauche*-Konformation im Vergleich zu den bisher diskutierten Phasen auf. Die Ordnung innerhalb des unpolaren Kerns der Doppelschicht nimmt im Vergleich zur gelförmigen Phase um Größenordnungen ab und ist eher mit einer Flüssigkeit zu vergleichen als mit einer Gitteranordnung im Festkörper. Ebenso sind Rotationen innerhalb der Ketten zu beobachten. Diese Rotationen sind schneller als in den anderen Phasen [13]. Der Hauptphasenübergang ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) wird dementsprechend maßgeblich von den Ketten bestimmt. Das Volumen pro Lipid nimmt im Vergleich zur gelförmigen Phase stark zu. Diese Volumenzunahme ΔV ist kettenlängenabhängig und nimmt mit wachsender Kettenlänge zu [53]. Ebenso nimmt die Umwandlungsenthalpie mit der Kettenlänge zu. Verglichen wird dieser Übergang daher mit dem Rotationsübergang von Paraffinen [54].

3.3.6 Hydratisierung

Die Hydratisierung der Kopfgruppen ist von besonderer Bedeutung für den Ionentransport durch die Membran. Röntgenbeugungsexperimente haben des Weiteren gezeigt, dass die Hydratisierung die Ausbildung und die Strukturen der Phasen beeinflusst. So bildet sich die zackige Phase $P_{\beta'}$ nur bei einem Wasser-Lipid-Konzentrationsverhältnis von mindestens 11:1 [44]. In den Arbeiten von Shipley und Mitarbeitern wird aus Röntgenbeugungsexperimenten in Abhängigkeit vom Wasser-Lipid-Verhältnis folgender maximaler Hydratisierungsgrad der einzelnen Lipide für die verschiedenen Phasen bestimmt: L_c (11:1 H_2O /Lipid); $L_{\beta'}$ (19:1 H_2O /Lipid); $P_{\beta'}$ (19:1 H_2O /Lipid); L_{α} (25:1 H_2O /Lipid). Diese Werte stimmen jedoch nicht mit den Arbeiten von Inoko [45] überein, der eine wesentliche Änderung der Hydratisierung am Vorphasenübergang beobachtet. Die obigen Messungen wurden alle an multilamellaren Schichten durchgeführt und beinhalten für die Berechnung der Hydratisierung unterschiedliche Modelle der einzelnen Schichten. Die Übertragbarkeit zu unilamellaren Vesikeln muss nicht gewährleistet sein. Insbesondere MD-Simulationen haben einen viel geringeren Hydratisierungsgrad in der flüssig-kristallinen Phase von 11-16 Wassermolekülen pro Lipid berechnet [25]. Eine direkte Messung der Hydratisierung der Kopfgruppe war bislang nicht möglich. Die hydratisierte kristalline Phase hat zum Beispiel große Ähnlichkeit mit der wasserfreien kristallinen Phase. Da die Messungen von Shipley und Mitarbeiter [34, 35] einen geringen Hydratisierungsgrad bestätigen und die Packungsdichte dieser Phase im Vergleich zu allen anderen Phasen die Höchste ist, wird diese Phase als am geringsten hydratisiert angesehen. Daraus folgt, dass der untere Phasenübergang mit einer Zunahme der Hydratisierung verbunden ist.

Eine Interpretation hinsichtlich des Hydratisierungsgrades der gelförmigen und zackigen Phase ist aufgrund der offensichtlichen Diskrepanz der existierenden Experimente erschwert. Neue Infrarotexperimente von Le Bihan und Pezolet [50] deuten auf eine weitere Zunahme der Hydratisierung am Vorphasenübergang hin. Experimente und Interpretationen von Cevz [55] ergeben ebenso, dass die zackige Phase stärker hydratisiert ist als die gelförmige Phase. Die stärkere Hydratisierung wird von Cevz als Triebkraft für das Bilden der Zacken angesehen. Des Weiteren existiert die zackige Phase nur bei einigen speziellen Kopfgruppen. Auch eine Abnahme des Wassergehalts unter 11 Wassermolekülen pro Lipid verhindert die Ausbildung dieser Phase. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der

Wassermoleküle beim Aufbau dieser Phase ist der direkte Bezug zwischen Wassergehalt und Periode sowie Amplitude der Zacken (siehe Kapitel 3.3.4). Alle Hinweise deuten beim Vorphasenübergang somit auf einen Kopfgruppeneffekt hin und eine Zunahme der Hydratisierung beim Übergang von $L_{\beta'}$ nach $P_{\beta'}$.

Die flüssig-kristalline Phase und die zackige Phase lassen nur einen groben Vergleich zu, denn das Gitter ändert sich von einer zweidimensionalen ($P_{\beta'}$) zu einer eindimensionalen Anordnung (L_{α}). Welche Auswirkungen dies auf die Hydratisierung hat, lässt sich nur erahnen. Ein Vergleich in einer Dimension würde eine deutlich vergrößerte Oberfläche für die flüssig-kristalline Phase bedeuten, während die zweite Dimension diesen Unterschied in der Oberflächengröße verringert. Unterschiedliche Messungen der Änderungen des Hydratisierungsgrades am Hauptphasenübergang erschweren das Verständnis dieses Übergangs weiter. Einzig die qualitative Aussage, dass der Hauptphasenübergang von den Ketten bestimmt ist, deutet auf keine großen Änderungen bei der Hydratisierung hin. Diese These wird durch einen vom Wassergehalt unabhängigen Phasenübergang gestützt.

Zusammenfassend nimmt die Hydratisierung, der obigen Diskussion entsprechend, am unteren Übergang und am Vorphasenübergang entscheidend zu, während am Hauptphasenübergang hauptsächlich Veränderungen im hydrophoben Kern der Doppelschicht stattfinden.

3.3.7 Molekulardynamik-Simulationen

Zu der flüssig-kristallinen Phase existieren eine Vielzahl von molekular-dynamischen Simulationen (MD-Simulationen) [25, 56-66]. Diese Simulationen versuchen die Dynamiken der Membran, die Solvation an der Grenzschicht und die Geometrie zu bestimmen. In Abbildung 3.6 sind Geometrieberechnungen der einzelnen hydratisierten Lipidphasen in einem dreidimensionalen Bild dargestellt [61]. Diese Berechnungen von Schulten und Mitarbeitern zeigen im Unterschied zu den meisten anderen Simulationen drei Phasen. Die unterschiedliche Ordnung der Phasen ist deutlich zu erkennen. Auch die Schichtdicke ändert sich beim Übergang von der kristallinen Phase zur flüssig-kristallinen Phase. Des Weiteren fällt die Ordnung der Wassermoleküle an der Grenzschicht der kristallinen Phase auf.

Abbildung 3.6: Kristalline Phase (links); gelförmige Phase (Mitte); flüssig-kristalline Phase (rechts) von DPPC-Lipiddoppelschichten ermittelt aus molekulardynamischen Simulationen [61]

Neben diesen qualitativen Aussagen über die Lipiddoppelschicht, geben solche Simulationen auch Informationen über die Polarisierung des Wassers im Bereich der gesamten Grenzschicht und über die Eindringtiefe des Wasser in die Grenzschicht [63]. Tieleman und Mitarbeiter teilen die Lipidmembran auf Grund ihrer Simulationen von außen nach innen in vier Regionen ein [25]. Die erste Region betrifft den Bereich, in dem Wasser von den Lipidkopfguppen beeinflusst wird. In der zweiten Region nimmt die Wasserdichte an der Grenzschicht bis auf Null ab. Die dritte Region ist bestimmt von einer hohen Kettendichte und wenig „freiem Volumen“. In der vierten Region ist die Dichte insgesamt gering. Die MD-Simulationen werden allgemein durch die Rechenzeit und die Rechnergeschwindigkeit begrenzt, so dass bei Systemen dieser Größe die realen Zeiten der Simulationen heutzutage unter einer Nanosekunde liegen. Diese Zeiten reichen zur Beschreibung der flüssig-kristallinen Phase aus. Die Dynamiken der anderen Phasen sind dagegen langsamer, so dass detaillierte Berechnungen schwer durchführbar sind.

3.3.8 Kommentar zu den Eigenschaften der Lipiddoppelschicht

In diesem Kapitel wurden die verschiedenen Phasen der Lipidmembran vorgestellt. Für die durchgeführten Messungen und die anschließende Diskussion sind insbesondere die Eigenschaften in Bezug auf den Vorphasenübergang von Bedeutung, da sich die Solvatationskorrelationsfunktion (Kapitel 6.4.3 Ergebnisse und Diskussion) an diesem Übergang stark verändert. Die Hydratisierung und die MD-Simulationen sollen neben den strukturellen Beobachtungen eine Diskussionsgrundlage für die Erklärung der beobachteten Unterschiede zwischen gelförmiger und zackiger Phase bilden.

4 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In diesem Kapitel wird das Phänomen der dynamischen Solvation anhand eines Zwei-Niveau-Systems erklärt und deren Zusammenhang mit dem Prozess der Phasenrelaxation erläutert. Experimentelle Ansätze zur Charakterisierung der Dynamik der Phasenrelaxation und der Solvation werden eingehend beschrieben.

Die Antwort eines vielatomigen Moleküls (z.B. eine Farbstoffsonde) auf einen optischen Lichtimpuls kann zunächst vereinfacht in einem elektronischen Zwei-Niveau-System beschrieben werden (Abbildung 4.1). Die zeitliche Entwicklung nach der optischen Anregung dieses Zwei-Niveau-Systems in Anwesenheit einer fluiden Umgebung ist jedoch nicht nur vom systemeigenen Hamiltonoperator bestimmt, sondern auch stark an die Umgebungsdynamik (Bad) gekoppelt. Eine vollständige und quantitative Beschreibung der zeitlichen Entwicklung muss sowohl Informationen über die Dynamik im System als auch über die Dynamik der Umgebung beinhalten.

In Abbildung 4.1 a.) ist das Zwei-Niveau-System bestehend aus elektronischem Grund- und angeregtem Zustand in Abhängigkeit einer verallgemeinerten Lösungsmittelkoordinate q dargestellt. Die Koordinate q umfasst sämtliche molekularen Freiheitsgrade des Bades, die an den optischen Übergangsdipol μ koppeln. Fluktuationen des Bades in der Koordinate q führen damit zu Fluktuationen in der elektronischen Energielücke $\hbar\omega$. Thermische Anregungen (d.h. Fluktuationen im thermischen Gleichgewicht) in der Koordinate q führen dadurch bereits zur Verbreiterung des linearen elektronischen Absorptionsspektrums.

Die elektronische Anregung mit einem Laserpuls bringt das System in den angeregten Zustand $|e\rangle$ (Abbildung 4.1 b.)). Dieser unterscheidet sich vom Grundzustand $|g\rangle$ durch eine veränderte Ladungsverteilung. Die Umgebung befindet sich somit im Nicht-Gleichgewicht bezüglich seiner Koordinaten q . Die Folge ist eine Bewegung entlang dieser Moden in Richtung der Gleichgewichtskonfiguration bezüglich der Ladungsdichteverteilung von $|e\rangle$.

Abbildung 4.1: a.) Thermische Fluktuationen (rot), die eine Verbreiterung des linearen Absorptionsspektrums bewirken;
b.) Solvensrelaxation (dynamische Solvation) nach optischer Präparation von $|e\rangle|e\rangle$.

Ein einfaches Beispiel verdeutlicht die Natur der verallgemeinerten Kernkoordinaten des Bades. Dreht die optische Anregung das Dipolmoment des Zwei-Niveau-Systems um 180° und besteht das Bad aus dipolaren Molekülen, so ist die primäre Komponente von q die Gesamtheit aller Winkel der individuellen Baddipole zum Dipolmoment des Systems im Zustand $|e\rangle$.

Die dynamische Minimierung der System-Bad-Wechselwirkungsenergie durch Variation der verallgemeinerten Badmoden q wird dynamische Solvation oder auch Solvensreorganisation genannt (roter Pfeil in Abbildung 4.1 b.)). Sie hat eine zeitabhängige Reduzierung der Energie im angeregten Zustand $|e\rangle$ zur Folge und äußert sich daher als dynamische Rotverschiebung („Stokes-Verschiebung“) des Emissionsspektrums nach gepulster elektronischer Anregung ($|e\rangle \rightarrow |g\rangle$).

Dynamische Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz und Verbreiterung der linearen Absorption sind im Grenzfall einer kleinen Störung der Ladungsdichteverteilung beim Übergang ($|e\rangle \rightarrow |g\rangle$) nicht unabhängig voneinander. Die lineare Antworttheorie

verlangt, dass die Zeitskala für thermische Fluktuationen im Gleichgewicht auch die Zeitskala definiert, mit der das Nichtgleichgewichtssystem relaxiert. Dies bedeutet, dass die System-Bad-Wechselwirkungspotentiale für den Grund- und elektronisch angeregten Zustand identisch sind. Sie unterscheiden sich lediglich in den Gleichgewichtskernlagen der verallgemeinerten Badmoden q . In diesem Fall ist die durch Lösungsmittelumorientierung in $|e\rangle$ freiwerdende Energie (Reorganisationsenergie λ) gleich der halben stationären Stokes-Verschiebung zwischen linearem Absorptions- und Emissionsspektrum. Die Dynamik der Solvation wird im Allgemeinen durch die Solvatationskorrelationsfunktion quantifiziert:

$$S(t) = \frac{\tilde{\nu}(t) - \tilde{\nu}(\infty)}{\tilde{\nu}(0) - \tilde{\nu}(\infty)}$$

Gleichung 4.1

wobei $\tilde{\nu}(t)$ die spektrale Position des zeitabhängigen Emissionsspektrums ist. Im Grenzfall der linearen Antwort ist diese Größe proportional zur Korrelationsfunktion $M(t)$ der Gleichgewichtsfluktuationen $\delta\omega_{eg}(t)$ der elektronischen Energielücke:

$$M(t) = \frac{\langle \delta\omega_{eg}(t) \delta\omega_{eg}(0) \rangle}{\langle \delta\omega_{eg}(0)^2 \rangle}$$

Gleichung 4.2

Diese Korrelationsfunktion $M(t)$ wird auch System-Bad-Korrelationsfunktion genannt, da die Fluktuationen $\delta\omega_{eg}(t)$ die thermischen Fluktuationen der System-Bad-Wechselwirkungsenergie reflektieren. Letztere resultieren ihrerseits aus thermischen Fluktuationen $\delta q(t)$ der Badkonfiguration.

Mit diesen Überlegungen ergibt sich daher ein ganz anderer Ansatz zum Studium der dynamischen Solvation, nämlich der Aufklärung von Gleichgewichtsfluktuationen, die zur Verbreiterung des linearen Absorptionsspektrums führen. Präpariert man in dem in Abbildung 4.1 dargestellten Zwei-Niveau-System eine elektronische Kohärenz $|e\rangle\langle g|$, so wird diese Kohärenz aufgrund von Fluktuationen $\delta q(t)$ zeitlich abklingen. Eine solche Kohärenz kann z.B. durch Wechselwirkung des Zwei-Niveau-

Systems mit einem $\pi/2$ -Puls (analog zur NMR-Spektroskopie) präpariert werden. Die erzeugte Polarisation (1.Ordnung) des makroskopischen Ensembles ist verantwortlich für die Emission des freien Induktionszerfalls (FID). Der FID ist derart gedämpft, dass dessen Fourier-Transformierte dem linearen Absorptionsspektrum entspricht (siehe Prinzip der 1D-FT-NMR). Die Dämpfung des FID bzw. die zeitliche Charakteristik des Kohärenzzerfalls wird auch durch die oben besprochenen Badfluktuationen bestimmt, die die elektronische Energielücke $|e\rangle \rightarrow |g\rangle$ modulieren. Prinzipiell lässt sich allerdings nicht entscheiden, ob der Kohärenzzerfall nicht auch durch eine breite aber statische Verteilung von Übergangsfrequenzen im Ensemble verursacht wird.

Die spektrale Lage ω_{eg} der elektronischen Resonanz des i-ten Chromophors im Ensemble lässt sich also zunächst prinzipiell zerlegen gemäß:

$$\omega_{eg}^i(t) = \langle \omega_{eg}^i \rangle + \varepsilon_i + \delta\omega_i(t)$$

Gleichung 4.3

Dabei ist $\langle \omega_{eg}^i \rangle$ der Trajektorienmittelwert der Übergangsfrequenz, ε_i ein statischer oder „inhomogener“ Beitrag und $\delta\omega_i(t)$ ein fluktuierender Term, der durch Badfluktuationen $\delta q(t)$ verursacht wird.

Sollen also die badinduzierten Fluktuationen der Übergangsfrequenz $\delta\omega(t)$ ermittelt werden (z.B. in der Form ihrer Autokorrelationsfunktion $M(t)$), so gilt es zunächst den statischen Beitrag ε zu eliminieren. Analog zum Spin-Echo der Kernspinresonanz bieten sich für elektronische Resonanzen Photon-Echo-Techniken an.

4.1 Elektronisches 2-Niveau-System in der Bloch'schen Beschreibung

Wir betrachten zunächst das 2-Niveau System aus Abbildung 4.1 unter dem Einfluss eines elektromagnetischen Feldes $E(t)$. Der Hamiltonoperator unter Vernachlässigung einer Kopplung an das Bad ist gegeben als:

$$\hat{H}(t) = \hat{H}_0 + \hat{\mu} \vec{E}(t),$$

Gleichung 4.4

wobei $\vec{E}(t) = \vec{E}_0(t) e^{i\Omega t} + \text{c.c.}$ und $\hat{\mu}$ der Übergangsdipoloperator ist. Der ungestörte Hamiltonoperator des 2-Niveau-Systems lautet:

$$\hat{H}_0 = \frac{1}{2} \hbar \omega_{\text{eg}} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}.$$

Gleichung 4.5

Die zeitliche Entwicklung der Dichtematrix ρ wird beschrieben durch die Liouville-van Neumann Gleichung

$$\dot{\rho} = -\frac{i}{\hbar} [\hat{H}, \rho].$$

Gleichung 4.6

Die Dichtematrix in der Wechselwirkungs-Darstellung (im sogenannten Bloch'schen Rahmen, der mit der Frequenz ω_{eg} des eingestrahlten elektromagnetischen Feldes rotiert) hat die Form

$$\tilde{\rho} = \begin{pmatrix} \rho_{11} & \rho_{12} e^{-i\Omega t/2} \\ \rho_{21} e^{i\Omega t/2} & \rho_{22} \end{pmatrix}.$$

Gleichung 4.7

In dieser Darstellung verschwinden alle mit Ω oszillierenden Nicht-Diagonalelemente des Hamilton-Operators:

$$\tilde{H} = \begin{pmatrix} \frac{1}{2}\hbar\Delta & -\mu_{12}E_0 \\ -\mu_{21}E_0 & \frac{1}{2}\hbar\Delta \end{pmatrix}.$$

Gleichung 4.8

Die Größe Δ entspricht der Laserverstimmung bezüglich der elektronischen Energielücke $\Delta = \Omega - \omega_{eg}$.

Die Kopplung des elektronischen 2-Niveau-Systems an das Wärmebad wird auf rein phänomenologische Weise mittels eines Relaxationsoperators $\hat{\Gamma}$ eingeführt:

$$\hat{H}_{\text{total}}(t) = \hat{H}(t) + \hat{\Gamma} \quad \text{bzw.} \quad \tilde{H}_{\text{total}}(t) = \tilde{H}(t) + \hat{\Gamma},$$

wobei $\hat{\Gamma}$ gegeben ist durch

$$\hat{\Gamma} = -\frac{1}{2} \begin{pmatrix} \frac{1}{T_1} & \frac{1}{T_2} \\ \frac{1}{T_2} & \frac{1}{T_1} \end{pmatrix}.$$

Gleichung 4.9

Die Diagonalelemente der Dichtematrix relaxieren mit der Populationsrelaxationszeit T_1 , während Kohärenzen (d.h. Nichtdiagonaleinträge in $\tilde{\rho}$) mit der Phasenrelaxationszeit T_2 zerfallen.

Damit wird ein Satz gekoppelter Differentialgleichungen erhalten, der die zeitliche Entwicklung der 2-Niveau-Dichtematrix unter dem gleichzeitigen Einfluss des elektromagnetischen Feldes und des Bades in der Wechselwirkungs-Darstellung beschreibt:

$$\dot{\tilde{\rho}} = \begin{pmatrix} i\chi(\tilde{\rho}_{21} - \tilde{\rho}_{12}) - \frac{1}{T_1} \tilde{\rho}_{11} & -i\chi(\tilde{\rho}_{22} - \tilde{\rho}_{11}) - \left(\frac{1}{T_2} - i\Delta\right) \tilde{\rho}_{21} \\ i\chi(\tilde{\rho}_{22} - \tilde{\rho}_{11}) - \left(\frac{1}{T_2} + i\Delta\right) \tilde{\rho}_{12} & -i\chi(\tilde{\rho}_{21} - \tilde{\rho}_{12}) - \frac{1}{T_1} \tilde{\rho}_{22} \end{pmatrix}.$$

Gleichung 4.10

Diesen Satz von Differentialgleichungen nennt man auch die optischen Bloch-Gleichungen. Die Rabi-Frequenz χ ist definiert als

$$\chi = \frac{\mu_{12} E_0(t)}{\hbar}.$$

Gleichung 4.11

Für Gleichung 4.10 existieren keine analytischen Lösungen. Diese sind aber erhältlich für zeitlich invariante Felder $E_0(t) = E$. Die formale Lösung lautet:

$$\tilde{\rho}(t) = \exp(i \mathcal{L} t) \rho(0),$$

wobei $\mathcal{L}$ der zeitunabhängige Liouville-Operator ist. Der Zeitentwicklungsoperator $\exp(i \mathcal{L} t)$ wird auch Green'sche Funktion genannt. Wir betrachten zunächst den FID nach Einstrahlung eines $\pi/2$ -Pulses, d.h.:

$$\chi \cdot t = \pi/2.$$

Gleichung 4.12

Zur Vereinfachung werden während Einstrahlung des Feldes Relaxationsphänomene vernachlässigt, so dass $1/T_2 = 1/T_1 = 0$ ist. Weiterhin sei die Verstimmung innerhalb der Pulsbandbreite vernachlässigbar. Anschließend wird das Feld abgeschaltet und die Dichtematrix propagiert für die Dauer t frei. Dies geschieht allerdings unter Berücksichtigung von Relaxation. Für $\tilde{\rho}(t)$ wird erhalten:

$$\tilde{\rho}(t) = \begin{pmatrix} 1 - e^{-t/T_1} & -ie^{(i\Delta - 1/T_2)t} \\ ie^{-(i\Delta + 1/T_2)t} & e^{-t/T_1} \end{pmatrix}.$$

Gleichung 4.13

Damit ergibt sich die feldinduzierte makroskopische Polarisation im Ensemble gemäß

$$P(t, \Delta) = N \cdot \text{Tr}[\mu_{12} \tilde{\rho}(t, \Delta)],$$

bzw.

$$P(t, \Delta) = N \cdot \mu_{12} \sin\{(\Omega + \Delta)t\} \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right).$$

Gleichung 4.14

Die Verstimmung Δ , die im Vergleich zur Pulsbandbreite vernachlässigbar war, spielt bei der freien Propagation eine entscheidende Rolle. Sie repräsentiert den statischen oder inhomogenen Beitrag zur zeitabhängigen elektronischen Energielücke gemäß Gleichung 4.3. Im allgemeinen wird eine Normalverteilung von elektronischen Bohrfrequenzen angenommen:

$$W(\Delta) = \frac{\sigma}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{\sigma}{2} \Delta^2\right).$$

Gleichung 4.15

Der Parameter σ repräsentiert damit die inhomogene Linienbreite. Die Polarisation muss über diese Verteilung gemittelt werden:

$$P(t) = \int_{-\infty}^{\infty} W(\Delta) P(t, \Delta) d\Delta.$$

Gleichung 4.16

Damit wird für den FID erhalten:

$$P(t) = N\mu_{12} \frac{\sigma}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma}\right).$$

Gleichung 4.17

Die Fouriertransformierte des FID liefert das lineare Absorptionsspektrum. Aus Gleichung 4.17 ist ersichtlich, dass anhand der Form des linearen Spektrums keinerlei Information über die badinduzierten Relaxationsphänomene erhalten werden kann.

Wir kommen nun zur 2-Puls-Echo-Sequenz, die analog zum Spin-Echo der Kernresonanzspektroskopie in der Lage ist, die inhomogene Linienbreite zu eliminieren. In diesem Experiment ist das 2-Niveau-System zwei konsekutiver Materie-Feld-Wechselwirkungen unterworfen, die durch eine freie Propagation für die Dauer τ getrennt sind (siehe Abbildung 4.2).

Abbildung 4.2: 2-Puls-Echo-Sequenz mit Polarisationsantwort

Die aus dieser Pulssequenz resultierende Polarisation muss wieder über die inhomogene Verteilung gemittelt werden:

$$P(t, \Delta) = \int_{-\infty}^{\infty} g(\Delta) \cdot N \cdot \text{Tr}[\mu_{12} \rho(t, \tau, \Delta)] d\Delta,$$

Gleichung 4.18

so dass sich ergibt:

$$P(t, \Delta) = 4N\mu_{12} \sin(\Omega t) \exp\left(-\frac{t + \tau}{T_2}\right) \exp\left(-\left(\frac{t - \tau}{\sigma}\right)^2\right).$$

Gleichung 4.19

Die Polarisation ist maximal, wenn $dP(t, \tau)/dt = 0$, d.h.

$$t_{\max} = \tau - \frac{\sigma}{T_2}.$$

Gleichung 4.20

Ist die Resonanz durch inhomogene Verbreiterung dominiert, dann ist $\sigma \rightarrow 0$. Zur Zeit $t_{\max} = \tau$ ist die Polarisation maximal. Das Ensemble emittiert also das sogenannte Photon-Echo. Verschwinden dagegen inhomogene Beiträge zur Resonanz, dann ist $\sigma \rightarrow \infty$. Die Polarisation klingt nach Einstrahlung des π -Pulses einfach exponentiell ab. Ein Echo existiert nicht. Im 2-Puls-Echo-Experiment misst ein Photodetektor wie gewöhnlich das zeitlich integrierte Betragsquadrat der Polarisation:

$$S(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} |P(t, \tau)|^2 dt.$$

Gleichung 4.21

Es wird somit folgender Ausdruck erhalten:

$$S(\tau) = \sqrt{4\pi} N \mu_{12}^2 \sigma \exp\left\{\left(\frac{\sigma}{T_2}\right)^2\right\} \exp\left(-\frac{4}{T_2} \cdot \tau\right).$$

Gleichung 4.22

Die Messung der Photon-Echo-Intensität als Funktion der relativen Verzögerung zwischen $\pi/2$ -Puls und π -Puls liefert damit die Phasenrelaxationszeit T_2 .

Es werden damit Informationen bezüglich badinduzierter Fluktuationen der elektrischen Energielücke zwischen dem elektronischen Grund- und angeregten Zustand in Form einer phänomenologischen Zeitkonstanten erhalten. Die obigen Bloch-Beschreibungen finden erfolgreiche Anwendung in Systemen, in denen eine deutliche Zeitskalentrennung anzutreffen ist. So ist in Gasen der homogene Beitrag zur Resonanzlinienbreite auf impulsive, unkorrelierte Stöße des 2-Niveau-Systems mit Badteilchen zurückzuführen, während die Dopplerverbreiterung solcher Resonanzen einen inhomogenen Beitrag liefert, den das Photon-Echo eliminieren kann. In Festkörpern werden homogene Linienbreiten aufgrund von Elektron-Phonon-Kopplung beobachtet, während Platzunordnungen rein statisch und daher in Echo-Experimenten rephasierbar, d.h. eliminierbar sind. In fluiden Medien ist hingegen eine strikte Zeitskalentrennung nur selten anzutreffen und eine phänomenologische Beschreibung von Phasenrelaxationsprozessen wird unzulässig. An dieser Stelle muss zunächst auf stochastische Modelle zur Resonanzbreite zurückgegriffen und diese in störungstheoretischen Lösungen der Bewegungsgleichung für die Dichtematrix berücksichtigt werden.

4.2 Stochastische Theorie zur Resonanzbreite nach Kubo

In der stochastischen Theorie nach Kubo [67-69] wird die Resonanzlinienform (z.B. die Absorption des Zwei-Niveau-Systems aus Abbildung 4.1) durch stochastische Badfluktuationen bestimmt, die auf variablen Zeitskalen stattfinden können.

Die Bewegungsgleichung für das System in Abbildung 4.1 ist die eines stochastisch gestörten Oszillators:

$$\dot{q}(t) = i \cdot \omega_{eg}(t) \cdot q(t).$$

Gleichung 4.23

Die stochastische Variable $\omega_{eg}(t)$ ist gegeben durch Gleichung 4.3, so dass mit der Randbedingung $q(t=0) = q_0$ die Lösung von Gleichung 4.23 gegeben ist als:

$$q(t) = q_0 \exp \left(i \cdot \int_0^t \omega(t') dt' \right).$$

Gleichung 4.24

Ist $\omega(t)$ eine stochastische Variable, dann ist $q(t)$ ein stochastischer Prozess, dessen Korrelationsfunktion geschrieben werden kann als:

$$\langle q(0) q(t) \rangle = \left\langle |q_0|^2 \exp \left(i \int_0^t \omega(t') dt' \right) \right\rangle.$$

Gleichung 4.25

Unter Berücksichtigung von Gleichung 4.3 ergibt sich

$$\langle q(0) q(t) \rangle = \exp(i \omega_0 \cdot t) \phi(t),$$

Gleichung 4.26

wobei $\omega_0 = \langle \omega_{eg} \rangle$ und

$$\phi(t) = \left\langle \exp \left(-i \int_0^t \delta\omega(t') dt' \right) \right\rangle$$

ist.

Der Prozess $\delta\omega(t)$ ist stationär mit einem Mittelwert $\langle \delta\omega(t) \rangle = 0$. Seine Korrelationsfunktion lautet:

$$\langle \delta\omega(0) \delta\omega(t) \rangle = \langle \delta\omega^2 \rangle \Psi(t).$$

Gleichung 4.27

Dabei ist $\langle \delta\omega^2 \rangle$ das mittlere Schwankungsquadrat der Fluktuationen der elektronischen Energielücke.

Handelt es sich darüber hinaus um einen Gauß'schen Prozess (d.h. die Wahrscheinlichkeitsdichte für n unabhängige Stichproben von $\delta\omega(t)$ entlang der Trajektorie entspricht einer Normalverteilung (siehe Abbildung 4.3 b.)), dann kann $\phi(t)$ aus der Korrelationsfunktion der Energielückenfluktuation berechnet werden gemäß [69]:

$$\phi(t) = \left\langle \exp \left(i \int_0^t \delta\omega(\tau) d\tau \right) \right\rangle = \exp \left\{ -\frac{1}{2} \int_0^t d\tau_1 \int_0^t d\tau_2 \langle \delta\omega(\tau_1) \delta\omega(\tau_2) \rangle \right\}.$$

Gleichung 4.28

Die Integration von τ_1 und τ_2 über das Quadrat wird in die Integration über das Dreieck, der Hälfte des Quadrats, geändert. Es ergibt sich:

$$\phi(t) = \exp \left\{ -\int_0^t d\tau_1 \int_0^{\tau_1} d\tau_2 \langle \delta\omega(\tau_1) \delta\omega(\tau_2) \rangle \right\}.$$

Gleichung 4.29

Eine Änderung der Integrationsvariablen und eine anschließende Integration liefert unter der Annahme von Stationarität folgendes Integral [69]:

$$\phi(t) = \exp \left\{ - \int_0^t d\tau (t - \tau) \langle \delta\omega(0) \delta\omega(\tau) \rangle \right\}.$$

Gleichung 4.30

Abbildung 4.3: Trajektorie der Energiefluktuationen eines Chromophors (a.) und zugehörige Wahrscheinlichkeitsverteilung, wenn der stochastische Prozess $\delta\omega(t)$ ein Gauß'scher Prozess ist (b.).

Unter Voraussetzung einer Markov-Modulation wird die Korrelationsfunktion nach Doob's Theorem [78, 79] durch eine Exponentialfunktion beschrieben:

$$\langle \delta\omega(0) \delta\omega(\tau) \rangle = \Delta^2 \exp \left(- \frac{\tau}{\tau_c} \right),$$

Gleichung 4.31

wobei $\Delta^2 = \langle \delta\omega^2 \rangle$ ist und die Korrelationszeit τ_c definiert wird gemäß:

$$\tau_c = \frac{1}{\Delta^2} \int_0^\infty \langle \delta\omega(0) \delta\omega(t) \rangle dt.$$

Gleichung 4.32

Durch Einsetzen von Gleichung 4.31 in Gleichung 4.30 und Integration über τ ergibt sich folgender Ausdruck für die Korrelationsfunktion $\phi(t)$:

$$\phi(t) = \exp \left\{ -\Delta^2 \int_0^t d\tau (t - \tau) \exp \left(-\frac{\tau}{\tau_c} \right) \right\} = \exp \left(-(\Delta \tau_c)^2 \left\{ \exp \left(-\frac{t}{\tau_c} \right) + \frac{t}{\tau_c} - 1 \right\} \right) = \exp(-g_{\text{Kubo}}(t)).$$

Gleichung 4.33

Die Funktion $g_{\text{Kubo}}(t)$ wird auch als Linienform- oder Linienbreitenfunktion bezeichnet [67-69]. Sie liefert durch Fourier-Transformation das Absorptionsprofil:

$$I(\omega - \omega_{\text{eg}}) = \text{FT}(\phi(t)) = \frac{1}{2\pi} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-i \cdot (\omega - \omega_{\text{eg}}) \cdot t) \cdot \phi(t) dt.$$

Gleichung 4.34

Es existieren zwei Grenzfälle, die dem homogenen und inhomogenen Limit der Bloch'schen Beschreibung entsprechen.

Der erste Fall bezieht sich auf vergleichsweise **lange Zeiten** ($t \gg \tau_c$). Die Linienverbreiterungsfunktion vereinfacht sich unter dieser Voraussetzung näherungsweise zu:

$$g(t) = \Delta^2 \tau_c t.$$

Gleichung 4.35

Die Fouriertransformation ergibt somit eine lorentzförmige Linienform:

$$I(\omega - \omega_{\text{eg}}) = \text{FT}(\exp(-\Delta^2 \tau_c t)) = \frac{1}{\pi} \cdot \frac{\Delta^2 \tau_c}{(\omega - \omega_{\text{eg}})^2 + (\Delta^2 \tau_c)^2}.$$

Gleichung 4.36

Für **kurze Zeiten** ($t \ll \tau_c$) verändert sich die Linienverbreiterungsfunktion zu:

$$g(t) = \frac{\Delta^2}{2} t^2.$$

Gleichung 4.37

In diesem Fall ergibt die Fouriertransformation eine gaußförmige Linienform:

$$I(\omega - \omega_{eg}) = \text{FT} \left(\exp \left(-\frac{\Delta^2}{2} t^2 \right) \right) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\Delta} \exp \left(-\frac{(\omega - \omega_{eg})^2}{2 \cdot \Delta^2} \right).$$

Gleichung 4.38

Diese Näherungen sind jedoch nicht unabhängig von der relativen Geschwindigkeit der Modulationen.

Bei vergleichsweise schnellen Modulationen ($\kappa = \Delta\tau_c < 1$) des Systems durch das Bad ist $\phi(t)$ noch ≈ 1 , wenn $\phi(t)$ den Bereich der Langzeitnäherung erreicht. Daher wird das Abklingverhalten von $\phi(t)$ vom Langzeitgrenzbereich beschrieben und es gilt Gleichung 4.36. Dieser Grenzfall der schnellen Modulationen wird auch „motional narrowing“-Bereich genannt.

Falls die Modulationen des Oszillators durch das Bad vergleichsweise langsam sind ($\kappa = \Delta\tau_c > 1$), ist $\phi(t)$ bereits sehr klein, wenn der Langzeitgrenzbereich erreicht wird. Für diesen sogenannten **statischen Grenzfall** wird daher das Abklingverhalten von $\phi(t)$ vom Kurzeitgrenzbereich wiedergegeben. Es resultiert somit eine gaußförmige Linienform (Gleichung 4.38).

Obwohl der zugrundeliegende Prozess markovisch ist, liefert die stochastische Theorie nach Kubo auch für den Übergang von homogen zu inhomogen in Abhängigkeit von $\Delta \cdot \tau_c$ eine Beschreibung der Linienform.

4.3 Störungstheoretische Beschreibung von Vier-Wellen-Mischen (4WM)

Kubo's Modell des stochastisch modulierten Oszillators kann genutzt werden, um im Rahmen störungstheoretischer Lösungen der Liouville-Gleichung, die optische Antwort des Systems zu berechnen. Wir entwickeln zunächst die Dichtematrix

$$\tilde{\rho} = \tilde{\rho}^{(0)} + \tilde{\rho}^{(1)} + \tilde{\rho}^{(2)} + \tilde{\rho}^{(3)} + \dots$$

Gleichung 4.39

Die individuellen störungsrechnerischen Ordnungen zu $\tilde{\rho}^{(3)}$ sind gemäß $P^{(i)} = N \cdot \text{Tr}[\mu \tilde{\rho}^{(i)}]$ Quellterme für eine makroskopische Polarisierung i-ter Ordnung im elektrischen Feld und sind verantwortlich für den FID ($i = 1$), für Frequenzverdopplung und Frequenzmischen in optisch anisotropen Materialien ($i = 2$) bzw. 4-Wellen-Mischen ($i = 3$) wie Photon-Echo-, Pump-Probe- oder transiente Gitterspektroskopie. Zur ersten Ordnung im E-Feld erhalten wir für die zeitabhängige Dichtematrix aus

$$\dot{\tilde{\rho}}^{(0)}(t) = -\frac{i}{\hbar} [\tilde{H}_{\text{total}}(t), \tilde{\rho}^{(0)}(t)]$$

Gleichung 4.40

den Ausdruck

$$\tilde{\rho}^{(1)}(t_2) = -\frac{i}{\hbar} \int_{-\infty}^{t_2} [\tilde{H}_{\text{total}}(t_3), \tilde{\rho}^{(0)}(t = -\infty)] dt_3$$

Gleichung 4.41

Ganz analog wird aus

$$\dot{\tilde{\rho}}^{(3)}(t) = -\frac{i}{\hbar} [\tilde{H}_{\text{total}}(t), \tilde{\rho}^{(3)}(t)]$$

Gleichung 4.42

das Ergebnis

$$\tilde{\rho}^{(3)}(t) = \left(-\frac{i}{\hbar} \right)^3 \int_{-\infty}^t \int_{-\infty}^{t_1} \int_{-\infty}^{t_2} dt_3 dt_2 dt_1 [\tilde{H}_{\text{total}}(t_1), [\tilde{H}_{\text{total}}(t_2), [\tilde{H}_{\text{total}}(t_3), \tilde{\rho}^{(0)}(t = -\infty)]]]$$

Gleichung 4.43

erhalten, wobei $t > t_1 > t_2 > t_3$ ist.

Mukamel und Mitarbeitern folgend, lässt sich die Polarisation 3.Ordnung darstellen gemäß:

$$P^{(3)}(t, t_{12}, t_{23}) \propto$$

$$\left(\frac{i}{\hbar} \right)^3 \exp\left(-\frac{t_{23}}{T_1} \right) \int_0^\infty dt_3 \int_0^\infty dt_2 \int_0^\infty dt_1 \left\{ \begin{aligned} & [R_2 + R_3] \times \\ & E_3(t - t_3) E_2(t + t_{23} - t_3 - t_2) E_1^*(t + t_{12} + t_{23} - t_3 - t_2 - t_1) \\ & \exp[-i(\omega_{\text{eg}} - \Omega)(t_3 - t_1)] \\ & \exp[-i(k_3 + k_2 - k_1) \cdot r] + \\ & [R_1 + R_4] \times \\ & E_3(t - t_3) E_2(t + t_{23} - t_3 - t_2 - t_1) E_1^*(t + t_{12} + t_{23} - t_3 - t_2) \\ & \exp[-i(\omega_{\text{eg}} - \Omega)(t_3 + t_1)] \\ & \exp[-i(k_3 + k_2 - k_1) \cdot r] \end{aligned} \right\} +$$

$$\left(\frac{i}{\hbar} \right)^3 \exp\left(-\frac{t_{23}}{T_1} \right) \int_0^\infty dt_3 \int_0^\infty dt_2 \int_0^\infty dt_1 \left\{ \begin{aligned} & [R_2 + R_3] \times \\ & E_3(t + t_{23} - t_3 - t_2) E_2(t - t_3) E_1^*(t + t_{12} + t_{23} - t_3 - t_2 - t_1) \\ & \exp[-i(\omega_{\text{eg}} - \Omega)(t_3 - t_1)] \\ & \exp[-i(k_3 + k_2 - k_1) \cdot r] + \\ & [R_1 + R_4] \times \\ & E_3(t + t_{23} - t_3 - t_2 - t_1) E_2(t - t_3) E_1^*(t + t_{12} + t_{23} - t_3 - t_2) \\ & \exp[-i(\omega_{\text{eg}} - \Omega)(t_3 + t_1)] \\ & \exp[-i(k_3 + k_2 - k_1) \cdot r] \end{aligned} \right\}$$

Gleichung 4.44

Die optische Energielücke ω_{eg} kann dem 1. Moment des linearen Absorptionsspektrums entnommen werden. Die Größe Ω ist wiederum die Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Felder $E_1(t)$ bis $E_3(t)$ mit den Wellenvektoren k_1 bis k_3 . Die Terme R_i sind die sogenannten nichtlinearen Antwortfunktionen, die für die Emission eines Echos in die Phasenanpassungsrichtung $k_3+k_2-k_1$ verantwortlich sind. Die Antwortfunktionen tragen der korrekten zeitlichen Entwicklung der Dichtematrix Rechnung, die bei der Wechselwirkung mit den drei konsekutiven E-Feldern berücksichtigt werden müssen. Diese sind in Abbildung 4.4 als doppelseitige Feynmann-Diagramme illustriert. Unter Ausnutzung einer Kumulanten-Entwicklung [72] lassen sich die nichtlinearen Antwortfunktionen R_i aus der Linienbreitenfunktion $g(t)$ berechnen gemäß:

$$\begin{aligned} R_1(t_3, t_2, t_1) &= \exp[-g^*(t_3) - g(t_1) - f_+(t_3, t_2, t_1)], \\ R_2(t_3, t_2, t_1) &= \exp[-g^*(t_3) - g^*(t_1) + f_+(t_3, t_2, t_1)], \\ R_3(t_3, t_2, t_1) &= \exp[-g(t_3) - g^*(t_1) + f_-(t_3, t_2, t_1)], \\ R_4(t_3, t_2, t_1) &= \exp[-g(t_3) - g(t_1) - f_-(t_3, t_2, t_1)], \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{mit} \quad f_-(t_3, t_2, t_1) &\equiv g(t_2) - g(t_2 + t_3) - g(t_1 + t_2) + g(t_1 + t_2 + t_3), \\ f_+(t_3, t_2, t_1) &\equiv g^*(t_2) - g^*(t_2 + t_3) - g(t_1 + t_2) + g(t_1 + t_2 + t_3). \end{aligned}$$

Gleichung 4.45

Die Funktionen R_2 und R_3 beschreiben das konventionelle Photon-Echo bei Anwesenheit von inhomogenen Beiträgen zur Linienbreite. Die Funktionen R_1 und R_4 entsprechen dem sogenannten virtuellen Echo und liefern Beiträge zur Polarisation 3. Ordnung, die stets zur Zeit $t = 0$ maximal sind (siehe auch FID und PE im homogenen Limit des Bloch-Modells). Wird in Gleichung 4.44 und Gleichung 4.45 die Kubo'sche Linienbreitenfunktion angewendet und wird $k_3 = k_2$ bzw. $t_3 = t_2$ gesetzt, so lässt sich ein 2-Puls-Photon-Echo im Modell des stochastisch modulierten Oszillators numerisch berechnen.

Abbildung 4.4: Feynman-Diagramme zur Beschreibung der nichtlinearen Antwortfunktion 3. Ordnung in Richtung des Wellenvektors $k_4 = k_3 + k_2 - k_1$. R_1 und R_4 beschreiben die nicht rephasierenden Terme (virtuelles Echo), während R_2 und R_3 die rephasierenden Antwortfunktionen für das reale Echo sind. Die Zeiten t_{23} und t_{12} sind am linken Rand markiert. Ein Pfeil in Richtung des Diagramms bedeutet Energiezufuhr (Absorption), während ein Pfeil weg vom Diagramm Energieabstrahlung (stimulierte Emission) anzeigt.

Eine Simulation des zeitlich-integrierten 2-Puls-Echos bei Verwendung von gaußförmigen Lichtimpulsen mit einer Dauer von 10 fs sind in Abbildung 4.5 gezeigt. Überraschenderweise lässt sich erkennen, dass im statischen Grenzfall des Kubo-Modells das 2-Puls-Echo nicht rein exponentiell abklingt. Dies ist umso erstaunlicher da die Linienform des Kubomodells ein gaußförmiges Profil vorhersagt, welches dem inhomogenen Grenzfall der Bloch'schen Beschreibung entspricht. Es sei angemerkt, dass die Abweichung vom rein exponentiellen Abklingen nicht auf Faltungseffekte mit den Lichtpulsen zurückzuführen ist.

Abbildung 4.5: Berechnete zeitlich integrierte 2-Puls-Echo-Signale

Bemerkenswerterweise ergibt sich, dass beim Übergang vom statischen Grenzfall zum Limit des „motional narrowings“ das Echo sich in Richtung verschwindender Verzögerungszeiten verschiebt. Dieser Effekt wird als „Photon-Echo-Peak-Shift“ bezeichnet. Die zeitliche Verzögerung des Echomaximums (beobachtet im konventionellen, zeitlich-integrierten Echo) ist ein direktes Maß für die Inhomogenität der System-Bad-Wechselwirkungen. Diese Beobachtung liefert die Grundlage für das später zu besprechende 3-Puls-Echo-Peak-Shift-Experiment, mit dem das Abklingen der System-Bad-Korrelationsfunktion quantitativ verfolgt werden kann.

4.4 Das Modell der Brown'schen Oszillatoren

Das Modell der Brown'schen Oszillatoren beruht auf dem Konzept, dass bestimmte Freiheitsgrade des Bades aus der Gesamtheit der Badmoden für die Kopplung an das 2-Niveau-System von herausragender Bedeutung sind. Diese relevanten Badmoden werden wie harmonische Oszillatoren behandelt. Deren Bewegungsgleichung ist gegeben durch eine verallgemeinerte Langevin-Gleichung

$$\mu \omega^2 q(t) + \mu \int_0^t \gamma_j(t - \tau) \cdot \dot{q}(\tau) d\tau + \mu \ddot{q}(t) = \mu F(t).$$

Gleichung 4.46

Die verbleibenden Badmoden resultieren in einer frequenzabhängigen Reibung und damit dem Reibungskernel $\hat{\gamma}(t)$, sowie einer stochastischen Kraft $F(t)$, die von den relevanten Badfreiheitsgraden wahrgenommen wird. Diese beiden badgemittelten Größen sind über das Fluktuations-Dissipations-Theorem miteinander verknüpft. Die Korrelationsfunktion $M(t)$ der Auslenkung des Brown'schen Oszillators hängt ebenfalls von der frequenzabhängigen Reibung ab und ist über die Laplace-Transformierte der Langevin-Gleichung erhältlich:

$$M(t) = \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s + \gamma(s)}{s^2 + s\gamma(s) + \omega^2} \right\},$$

Gleichung 4.47

wobei $\gamma(s) = \int_0^\infty e^{-st} \hat{\gamma}(t) dt$ und $\mathcal{L}^{-1}$ die inverse Laplace-Transformation ist.

Die Frequenzabhängigkeit der Reibung wird im Allgemeinen vernachlässigt, so dass sich

$$\gamma(s) = \gamma(s = 0) = \gamma$$

Gleichung 4.48

ergibt. Diese sogenannte Markov'sche Näherung ist zulässig, wenn die stochastische Kraft aus Gleichung 4.46 schneller flukuiert als die Bewegungen des Oszillators.

Die Korrelationsfunktion $M(t)$ kann ihrerseits genutzt werden, um eine zum Kubo-Modell analoge Linienbreitenfunktion $g(t)$ zu formulieren:

$$g(t) = \Delta^2 \int_0^t d\tau_1 \int_0^{\tau_1} d\tau_2 M'(\tau_2) - i\lambda \int_0^t d\tau_3 [1 - M''(\tau_3)],$$

Gleichung 4.49

wobei $M'(t)$ der Realteil und $M''(t)$ der Imaginärteil von $M(t)$ sind.

Wir betrachten im folgenden zwei Spezialfälle von Brown'schen Oszillatoren:

1.) Untergedämpfte Moden, $\gamma \ll 2\omega$

$$M(t) = \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s + \gamma}{s^2 + s\gamma + \omega} \right\}.$$

Gleichung 4.50

Daraus ergibt sich

$$M(t) = \exp\left(-\frac{\gamma \cdot t}{2}\right) \left[\cos(\Omega \cdot t) + \frac{\gamma}{2\Omega} \sin(\Omega \cdot t) \right],$$

Gleichung 4.51

mit $\Omega = \sqrt{\omega^2 + \left(\frac{\gamma}{2}\right)^2}$ und $M'(t) = M''(t) \equiv M(t)$.

Die Korrelationsfunktion entspricht einer gedämpften Schwingung. Im linearen Absorptionsspektrum resultiert sie in einer Feinstruktur. Daher kann dieser Fall genutzt werden, um chromophorspezifische Franck-Condon-Progressionen zu reproduzieren.

2.) Stark übergedämpfte Moden, $\gamma \gg 2\omega$

Im Fall stark übergedämpfter Moden vereinfacht sich die Langevin –Gleichung zu:

$$\omega^2 q(t) + \gamma \cdot \dot{q}(t) = F(t).$$

Gleichung 4.52

Daraus folgt:

$$M(t) = \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{\gamma}{\omega^2 + \gamma s} \right\}$$

Gleichung 4.53

und somit

$$M(t) = e^{-\Lambda t} = M'(t) = M''(t).$$

Gleichung 4.54

mit $\Lambda = \omega^2/\gamma$. Die Bewegung des Oszillators ist rein diffusiv. Dies liegt an der Vernachlässigung des Beschleunigungsterms $\mu \ddot{q}(t)$. Eine Trägheitsbewegung des Oszillators zu frühen Zeiten existiert nicht. Stark übergedämpfte Moden können genutzt werden, um die für Flüssigkeiten typische Debye-Relaxation als Folge Brown'scher Rotationsdynamik zu simulieren. Einsetzen von Gleichung 4.54 in Gleichung 4.49 liefert für die Linienbreitenfunktion $g(t)$ den stark übergedämpften Oszillator:

$$g_{\text{MBO}}(t) = g_{\text{Kubo}}(t) + i \cdot \lambda \tau_c \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_c}\right) \right],$$

Gleichung 4.55

wobei $\tau_c = \Lambda^{-1}$. Daraus wird ersichtlich, dass das Modell der Brown'schen Oszillatoren für stark übergedämpfte Moden zu Kubo's stochastischer Theorie zur Resonanzbreite äquivalent ist.

4.5 Drei-Puls-Echo-Spektroskopie

Die Drei-Puls-Echo-Spektroskopie unterscheidet sich von der 2-PE-Spektroskopie in einer zusätzlichen Verzögerungszeit t_{23} . Es handelt sich daher um eine zweidimensionale Spektroskopie. Den Feynmann-Diagrammen (Abbildung 4.4) entnehmen wir, dass sich das System während der Zeit t_{23} entweder im Grundzustand oder im angeregten Zustand befindet. Aus diesem Grund kann das Drei-Puls-Echo (3-PE) zum Studium von spektraler Diffusion [72, 73] verwendet werden. Die Verzögerung t_{23} definiert dabei die Zeitskala, auf der ein Prozess homogen beziehungsweise inhomogen erscheint. In Abbildung 4.6 ist die Pulssequenz eines 3-PE-Experiments veranschaulicht. Die drei elektromagnetischen Felder sind mit E_1 bis E_3 gekennzeichnet. Die erzeugte Polarisation $P^{(3)}$ ist grau schraffiert dargestellt.

Abbildung 4.6: Dargestellt ist die 3-Puls-Echo-Sequenz und die abgestrahlte Polarisation $P^{(3)}$.
Die 2-Puls-Echo-Sequenz ergibt sich für $t_{23} = 0$.

Die Observable des 3-Puls-Echos ist:

$$I(t_{23}, t_{12}) = \int_0^\infty \left| P^{(3)}(t, t_{23}, t_{12}) \right|^2 dt.$$

Gleichung 4.56

Die Intensität I wird für einen festen Zeitabstand zwischen dem zweiten und dritten Puls ($t_{23} = \text{konstant}$) in Abhängigkeit von t_{12} bestimmt.

In molekularen Flüssigkeiten wird häufig beobachtet, dass die System-Bad-Korrelationsfunktion auf zwei Zeitskalen abklingt. Der Realteil der Korrelationsfunktion $M(t)$ kann dann in einen schnellen und einen langsamen Anteil zerlegt werden [74, 75]:

$$M'(t) = (1 - a) \cdot M'_{\text{fast}}(t) + a \cdot M'_{\text{slow}}(t). \quad 0 \leq a \leq 1$$

Gleichung 4.57

Es ist zu beachten, dass Kubo's stochastische Theorie einen solchen Fall nicht berücksichtigt. Das Modell der Brown'schen Oszillatoren allerdings beinhaltet ein solches Abklingen von $M(t)$. So ist vorstellbar, dass das Langzeitverhalten von $M(t)$ durch einen stark übergedämpften Oszillator gekennzeichnet ist, während das Kurzzeitverhalten durch destruktive Interferenz einer Vielzahl von untergedämpften Oszillatoren charakterisiert wird. In diesem Fall kann $g(t)$ als $\sum g(t)$ angesetzt werden.

Gleichung 4.57 gilt nur dann, wenn der schnelle Anteil zur Zeit t_{23} gleich Null ($M'_{\text{fast}}(t) = 0$ für $t \geq t_{23}$) ist und M'_{slow} auf Zeitskalen von t und t_{12} stationär bleibt. Mathematische Vereinfachungen führen zu folgendem Zusammenhang [75, 76]:

$$I(t_{23}, t_{12}) \propto \exp\left(-\frac{2t_{23}}{T_1}\right) \exp\left[-\Delta^2 t_{12}^2 (1 - a^2 M'_{\text{slow}}(t_{23}))\right] \times \left\{ \frac{\sqrt{\pi}}{2} + \text{erf}\left[\Delta \cdot a \cdot M'_{\text{slow}}(t_{23}) \cdot t_{12}\right] \right\}.$$

Gleichung 4.58

Die Abkürzung „erf“ steht für die Fehlerfunktion:

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_0^x \exp(-t^2) dt.$$

Gleichung 4.59

Es sei betont, dass der Imaginärteil $M''(t)$ der Korrelationsfunktion innerhalb dieser Näherungen keinen Einfluss auf das Signal hat. In Abbildung 4.5 (Kubo-Modell) wurde gezeigt, dass sich mit zunehmendem $\Delta\tau_c$ das Maximum des 2-Puls-Echos zu

größeren Verzögerungszeiten verschiebt. Es stellt sich die Frage, ob mit Hilfe der 3-Puls-Echo-Spektroskopie das Abklingverhalten der Funktion $M(t)$ verfolgt werden kann. Hierzu wird die Position des Echo-Maximums in Abhängigkeit von t_{23} berechnet. Dieses wird durch Nullsetzen der ersten Ableitung von $I(t_{23}, t_{12})$ nach $t_{12} = \tau$ bestimmt [74] und definiert eine Funktion $S(t_{23})$ durch:

$$\left. \frac{dI(t_{23}, t_{12})}{dt_{12}} \right|_{t_{12}=S(t_{23})} = 0.$$

Gleichung 4.60

Diese neue Funktion $S(t_{23})$ wird Echo-Peakshift-Funktion genannt. Die Gleichung 4.58 vereinfacht sich dadurch zu:

$$a \cdot M'_{\text{slow}}(t_{23}) \cdot \exp\left[-\Delta^2 a^2 M'_{\text{slow}}(t_{23})^2 S(t_{23})^2\right] - \Delta \cdot S(t_{23}) \times \\ \left[1 - a^2 (M'_{\text{slow}}(t_{23}))^2\right] \left\{ \sqrt{\pi} + 2 \cdot \text{erf}\left[\Delta \cdot a \cdot M'_{\text{slow}}(t_{23}) \cdot S(t_{23})\right] \right\} = 0.$$

Gleichung 4.61

Da der schnelle Anteil in den meisten Fällen dominiert, werden nur die linearen Komponenten von a berücksichtigt:

$$a \cdot M'_{\text{slow}}(t_{23}) = \frac{\Delta \sqrt{\pi} \cdot S(t_{23})}{1 + 2\Delta^2 S^2(t_{23})}.$$

Gleichung 4.62

Im Grenzfall hoher Temperaturen folgt unter der Annahme, dass $\Delta^2 S^2(t_{23}) \ll 1$ gilt:

$$M_{\text{slow}}(t_{23}) = M'_{\text{slow}}(t_{23}) = M''_{\text{slow}}(t_{23}) = \frac{\Delta \sqrt{\pi}}{a} S(t_{23}).$$

Gleichung 4.63

Bei Gleichung 4.63 handelt es sich um einen direkten Zusammenhang zwischen dem 3-Puls-Echo-Peakshift (3-PEPS) und dem langsamen Anteil der System-Bad-Korrelationsfunktion $M(t)$. Bei diesem Ergebnis ist von Bedeutung, dass es keine Abhängigkeit von der Populationsrelaxationszeit T_1 gibt.

Zu frühen Zeiten lässt sich allerdings zeigen, dass die Korrelationsfunktion nicht mehr der 3-PEPS-Kurve entspricht. Eine Taylor-Reihenentwicklung der Korrelationsfunktion $M(t)$ um $t = 0$ liefert eine Steigung von Null [74, 77]:

$$M'(t) = 1 - \frac{\omega_0^2 t^2}{2}.$$

Gleichung 4.64

Die Steigung der 3-PEPS-Kurve ergibt dagegen folgenden Ausdruck [74-76]:

$$\lim_{t_{23} \rightarrow +0} \left(\frac{dS(t_{23})}{dt_{23}} \right) = \frac{-1}{2 + \frac{4}{3} \Delta^2 S^2(t_{23} = 0) [1 + 2\omega_0^2 S^2(t_{23} = 0)]}.$$

Gleichung 4.65

Die Steigung für $t_{23} = 0$ ist folglich negativ. Der genaue Zeitpunkt des Übergangs zwischen M'_{fast} und M'_{slow} ist ungenau bestimmt und lässt sich nur über Ermittlung und Überprüfung der Korrelationsfunktion erhalten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit Ausnahme der Kurzzeitdynamiken der 3-Puls-Echo-Peakshift zur Bestimmung der System-Bad-Korrelationsfunktion verwendet werden kann. Der direkte Zusammenhang und die einfache Detektion des Signals haben diese Spektroskopie zu einem häufig eingesetztem Werkzeug zur Bestimmung der Solvatationsdynamik in molekularen Flüssigkeiten [78-80] gemacht. In den später zu beschreibenden Experimenten zur Solvatationsdynamik an Lipid-membran-Grenzschichten wurde ebenfalls diese Technik verwendet.

4.6 Transiente Gitter Spektroskopie

Bei der Erzeugung und der Abfrage eines transienten Gitters („transient grating“, TG) handelt es sich wie bei der Photon-Echo-Spektroskopie um Vier-Wellen-Mischen (4WM). Analog der Photon-Echo-Spektroskopie wird das Signal in Form des zeitintegrierten Quadrates der Polarisierung dritter Ordnung $P^{(3)}$ gemessen [81]:

$$I_{\text{TG}}(t_{23}) = \int_0^{\infty} \left| P^{(3)}(t_{12} = 0, t_{23}, t) \right|^2 dt ,$$

Gleichung 4.66

mit $P^{(3)}$ aus Gleichung 4.44. Im Gegensatz zum 2-PE ($t_{23} = 0$) und 3-PE, bei dem sowohl t_{23} als auch t_{12} variiert werden, ist beim transienten Gitter Experiment $t_{12} = 0$. Die Lichtwellen 1 und 2 werden somit zeitgleich eingestrahlt. In den im Kapitel 4.4, Abbildung 4.4 gezeigten Feynmann-Diagrammen bedeutet dies, dass sich das System nach der zweiten Materie Feldwechselwirkung im Grundzustand bzw. im angeregten Zustand ($|g\rangle \langle g|$; $|e\rangle \langle e|$) befindet. Ist die Bandbreite der Laserpulse größer als der Energieabstand benachbarter Schwingungszustände bzw. die Pulsdauer kleiner als die Schwingungsperiode, so wird eine kohärente Wellenpaketdynamik induziert.

Der dritte Puls erzeugt nochmals eine elektronische Kohärenz (siehe Feynmann-Diagramme Abbildung 4.4). Die resultierende Polarisierung 3. Ordnung ist wiederum verantwortlich für die Emission von Licht in Richtung $k_4 = -k_1 + k_2 + k_3$. Das zeitlich integrierte Betragsquadrat dieser Polarisierung als Funktion von t_{23} ist durch die Schwingungs-Wellenpaketdynamik moduliert. Unter Berücksichtigung der Signalbeiträge, in denen der dritte Puls zeitgleich oder vor den beiden anderen Laserpulsen eingestrahlt wird kann das Signal I_{TG} in folgender Form beschrieben werden [82]:

$$I_{\text{TG}}(t_{23}) = \left| A \cdot \exp\left(-\frac{t_{23}^2}{\Delta^2}\right) + \sum_{i=1}^{3n-5 \text{ oder } 3n-6} B_i \cos(\omega_i t_{23} + \phi_i) + C \cdot R_{\text{rot}} \right| .$$

Gleichung 4.67

Der erste Term, eine Gaußfunktion mit der Amplitude A , berücksichtigt die oben erwähnten Anteile des Signals für negative Zeiten t_{23} und den Bereich, in dem die drei Pulse zeitgleich in der Probe eintreffen. Δ bestimmt die zeitliche Breite dieses Anteils. Die weiteren Terme repräsentieren die Wellenpaketsdynamik. Die Summe ($3n-5$ für lineare beziehungsweise $3n-6$ für gewinkelte Moleküle, n = Anzahl der Atome) gibt die Schwingungen des Chromophors im Grund- und angeregten Zustand wieder. Die Schwingungen werden durch die zeitabhängige Amplitude B_i und die Phase ϕ_i der Moden i mit der Frequenz ω_i beschrieben. Zuletzt wird die Rotation des Farbstoffs mit einer Amplitude C und einem Term R_{rot} berücksichtigt [82].

TG Messungen sind äquivalent zum Pump-Probe-Experiment, bei dem in gleicher Weise sowohl Grundzustand als auch angeregter Zustand abgefragt werden. Beim Pump-Probe-Experiment kommen die beiden ersten Feldwechselwirkungen vom gleichen Puls, dem Pump-Puls. Das Signal wird daher in die Richtung $-k_1+k_1+k_3$ abgestrahlt, welches der Richtung k_3 des 3.Feldes entspricht. Beim Pump-Probe-Experiment ist daher die Polarisation dritter Ordnung identisch zu der des transienten Gitters. Die Detektion der Polarisation 3. Ordnung geschieht dann allerdings in „Vorwärtsrichtung“, also in Interferenz mit dem 3. E-Feld (Optische Heterodyn-Detektion).

Durch ein physikalisches Bild lässt sich das transiente Gitter, wie in Abbildung 4.7 a.) gezeigt, veranschaulichen [82]. In diesem Bild überlappen die eingestrahnten elektromagnetischen Felder in der Probe. Auf Grund von konstruktiver und destruktiver Interferenz bildet sich ein transientes Gitter in der Probe aus. Dieses Gitter zerfällt mit der Zeit durch Populationsrelaxation und wird durch die Schwingungen der Moleküle moduliert.

Abbildung 4.7: Transientes Gitter: a.) schematisches Bild; b.) Boxchargeometrie

Der dritte Strahl wird nun im Bragg Winkel [83] an diesem Gitter gebeugt. In Abbildung 4.7 b.) ist die Signalabstrahlung für den Fall der Boxchargeometrie gezeigt. Die zuvor eingestrahnten Felder E_1 , E_2 , E_3 erzeugen ein Signal in Richtung der noch freien Ecke eines Quadrates $k_4 = -k_1 + k_2 + k_3$.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Lasersystem

Das bei den Messungen eingesetzte Lasersystem besteht aus einem kommerziellen regenerativen Verstärkersystem (Clark Inc., CPA-2001) (Kapitel 5.1.1) und einem nichtkollinearen optisch-parametrischen Verstärker (NOPA) (Kapitel 5.1.2).

5.1.1 Regenerativer Verstärker

Der CPA-2001 (CPA = „chirped pulse amplifier“) [84-88] emittiert Laserpulse mit einer Pulsdauer von 150 fs bei einer Zentralwellenlänge von 775 nm. Die Repetitionsrate der Laserpulse beträgt 1 kHz und die Pulsenergie ca. 850 μ J.

Die Pulse werden in einem ringförmigen Resonator mit einer mit Erbiumionen (Er^{3+}) dotierten Glasfaser als aktives Medium erzeugt [89-91]. Die Glasfaser wird mit der Strahlung eines Diodenlasers gepumpt, der Licht bei einer Zentralwellenlänge von 980 nm mit einer Leistung von ca. 900 mW emittiert. Die Einkopplung der Strahlung des Diodenlasers in die Glasfaser erfolgt mit einem WDM-Koppler („wavelength-division multiplexer“, WDM). Danach emittiert die Faser Licht bei einer Wellenlänge von 1550 nm. Durch den Einsatz von polarisationsadditiver Pulsmodenkopplung [90] („polarisation additive pulse mode-locking“, P-APM) wird der Faserlaser in den Pulsmodus versetzt. Diese Variante der Modenkopplung nutzt die intensitätsabhängige Rotation der Polarisation einer elliptisch polarisierten Lichtwelle in einem Kerr-Medium aus. Die Polarisation der maximalen Intensität der umlaufenden Lichtwelle wird stärker gedreht als die Flanken, so dass durch eine Kombination aus $\lambda/2$ -Platte und Polarisator nur große Intensitäten des Lichtpulses verstärkt werden.

Der emittierte Puls wird nach Auskopplung aus dem Oszillator mit einer Prismenkombination zeitlich auf ca. 100 fs komprimiert und in einem Kristall frequenzverdoppelt (775 nm). Anschließend wird der Puls erneut gestreckt und in einen regenerativen Verstärker (RGA) eingekoppelt. Dieser beinhaltet einen mit Titanionen (Ti^{3+}) dotierten Saphir-Kristall (Ti:Sa) als Lasermedium. Als Pumpquelle dient ein im CPA-2001 eingebauter frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (Wellenlänge 532 nm, Pulsenergie 8 mJ). Die Pulse werden mit einer Frequenz von

1 kHz mit einer Pockelszelle in den RGA ein- und ausgekoppelt und anschließend wieder zeitlich komprimiert. Die vor der regenerativen Verstärkung durchgeführte Pulsstreckung ist notwendig, um unterhalb der Zerstörungsschwelle des Verstärkungsmediums Ti:Sa zu bleiben [84, 92-94].

Die Stabilität des Lasers und die Anzahl der Umläufe im RGA werden durch die Beobachtung der Intensität der sich im RGA aufbauenden Pulse mittels einer schnellen Photodiode (Anstiegszeit < 500 ps) und einem Oszilloskop (Tektronix 485, 350 MHz) kontrolliert. Am Ausgang des CPA-2001 stehen Pulse mit einer Energie von $850 \mu\text{J}$ und eine Dauer von 150 fs zur Verfügung. Diese werden zum Pumpen des nachfolgend beschriebenen nichtkollinearen optisch-parametrischen Verstärkers verwendet.

5.1.2 Nichtkollinearer optisch-parametrischer Verstärker (NOPA)

Mit einem NOPA („noncollinear optical parametrical amplifier“) ist es möglich, ultrakurze Laserpulse im gesamten sichtbaren Spektralbereich zu generieren [95-100]. Der NOPA eignet sich daher für Photon-Echo-Experimente, da bei diesen Experimenten das Laserspektrum dem über 100 nm breiten Anregungsspektrum des Farbstoffs angepasst werden muss.

5.1.2.1 Theorie der parametrischen Verstärkung im NOPA

Bei der parametrischen Verstärkung [101, 102] werden zwei Laserpulse, ein Pump- (E_P) und ein Seedpuls (E_S), mit unterschiedlicher Intensität in ein nichtlineares Medium eingestrahlt (Abbildung 5.1).

Abbildung 5.1: Parametrische Verstärkung [102]

Die Energie des intensiveren Pumpulses wird bei der parametrischen Verstärkung auf zwei Lichtfelder mit geringerer Frequenz (E_s Signal und E_i Idler) transferiert. Eingeleitet wird der Energietransfer durch einen im Vergleich zum Pumpuls schwachen Seedpuls. Im vorliegenden Aufbau wird ein Weißlichtkontinuum verwendet, das die Funktion des Signalpulses übernimmt (Abbildung 5.1). Bei der parametrischen Verstärkung handelt es sich um eine Drei-Wellen-Mischung, für die Impulserhaltung (Phasenanpassung)

$$\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_i \quad \text{mit} \quad k = n(\omega) \cdot \frac{\omega}{c}$$

Gleichung 5.1

und Energieerhaltung

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i$$

Gleichung 5.2

gelten. Dabei beschreibt k den Wellenvektor des Lichtfeldes, ω seine Frequenz und c die Lichtgeschwindigkeit. Die Indizes p , s und i kennzeichnen Pump-, Signal- und Idlerwellen. Die beiden Gleichungen lassen sich gleichzeitig nur in anisotropen Medien erfüllen, in denen sich der ordentliche Brechungsindex n_o vom außerordentlichen Brechungsindex n_e unterscheidet. Zwei Arten der Phasenanpassung werden allgemein genutzt. Bei der Phasenanpassung vom Typ I sind Signal- und Idlerwelle bezüglich der optischen Achse des Kristalls entweder beide parallel (ordentlich, o) oder beide senkrecht (außerordentlich, e) polarisiert, während bei der Typ II-Phasenanpassung entweder der Signalpuls oder der Idlerpuls ordentlich und der jeweils andere außerordentlich polarisiert ist.

Der Phasenanpassungswinkel α_p (Abbildung 5.3 a.)) zwischen Pumpstrahl und optischer Achse des anisotropen Kristalls bei der Phasenanpassung nach Typ I ergibt sich zu [103, 104]:

$$\alpha_p = \arcsin \left[\frac{\left(\frac{1}{\frac{\lambda_p}{\lambda_s} \cdot n_o(\lambda_s) \cdot \cos \theta_s + \frac{\lambda_p}{\lambda_i} \cdot n_o(\lambda_i) \cos \theta_i} - \frac{1}{n_o(\lambda_p)^2} \right)^2}{\frac{1}{n_e(\lambda_p)^2} - \frac{1}{n_o(\lambda_p)^2}} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Gleichung 5.3: Phasenanpassungswinkel α_p : a.) kollinear $\theta_i = \theta_s = 0^\circ$
b.) nichtkollinear $\theta_i \neq 0^\circ; \theta_s \neq 0^\circ$

Bei $\theta_i = \theta_s = 0^\circ$ spricht man von kollinearer Phasenanpassung. Für eine gegebene Pumpwellenlänge ergibt sich dann je nach gewünschter Signalwellenlänge der Phasenanpassungswinkel. Wird als Pumpquelle das frequenzverdoppelte Licht des CPA-2001 ($\lambda_p = 387.5 \text{ nm}$) verwendet, ergibt sich im kollinearen Fall die in Abbildung 5.2 mit $\theta_s = 0^\circ$ gezeichnete Kurve. Die Wellenlängenabhängigkeit des Phasenanpassungswinkels α_p im kollinearen Fall ermöglicht nur die Verstärkung eines kleinen Bereiches des sichtbaren Spektrums. Eine Erzeugung ultrakurzer Laserpulse ist daher erschwert. Hinzu kommt der Gruppengeschwindigkeitsunterschied („group velocity mismatch“; GVM) zwischen Signal- und Idlerwelle ($v_i > v_s$), der zu einem zeitlichen Auseinanderlaufen dieser beiden Wellen führt. Durch die parametrische Verstärkung beider Wellen wird der erzeugte Puls daher zeitlich verlängert. Diese Problematik lässt sich mit einer nichtkollinearen Geometrie (Abbildung 5.3 a.)) lösen. In diesem Fall ergibt sich die Phasenanpassungsbedingung aus Gleichung 5.3 zu:

$$k_p = k_s \cdot \cos \theta_s + k_i \cdot \cos \theta_i.$$

Gleichung 5.4

Abbildung 5.2: Phasenanpassungswinkel α_p aufgetragen als Funktion der Signalwelle für unterschiedliche Einstrahlungswinkel θ_s des Seedpulses [105].

Abbildung 5.2 zeigt, dass für einen Winkel von $\theta_s = 3.7^\circ$ zwischen Pump- und Signalwelle, der Phasenanpassungswinkel α_p zwischen Pumpstrahl und optischer Achse des Kristalls im Bereich von 500 nm bis 750 nm sich nur um 2° ändert. In dieser Geometrie ist somit eine spektral breitbandige Verstärkung möglich.

Abbildung 5.3: Nichtkollineare optisch-parametrische Verstärkung [106, 107]

a.) Wellenvektoren b.) Geschwindigkeitsvektoren; $\alpha, \theta = \text{Winkel}$;

$v = \text{Gruppengeschwindigkeiten der einzelnen Lichtwellen}$; $k = \text{Wellenvektor}$.

Neben dem über einen großen Teil des sichtbaren Spektralbereich nahezu gleichbleibendem Phasenanpassungswinkel ändert sich bei nichtkollinearer Geometrie auch der Gruppengeschwindigkeitsunterschied (GVM). Für den GVM ist nun nur noch die Projektion (Abbildung 5.3 b.)) der Gruppengeschwindigkeit der Idlerwelle v_i auf die Signalwelle von Bedeutung (Gleichung 5.5) [105]:

$$v_s = v_i \cdot \cos(\theta_s + \theta_i) \quad \text{mit} \quad \text{GVM} = v_s - v_i.$$

Gleichung 5.5

Es lässt sich zeigen, dass bei einer nichtkollinearen Anordnung mit einem Winkel von $\theta_s = 3.7^\circ$ der GVM zwischen Signal und Idler bei Signalwellenlängen zwischen 500 nm und 750 nm zu keiner weiteren Pulsverbreiterung führt [108].

5.1.2.2 Aufbau des NOPA

Abbildung 5.4: Aufbau des nichtkollinearen optisch-parametrischen Verstärkers (NOPA);

S1 - S2 = Silberspiegel; L1 - L5 = Linsen; LBO = Lithiumtriborat-Kristall;

BBO = β -Barium-Borat-Kristall; QP = Quarzplatte; QK = Quarzkeil;

PR1 - PR2 = Quarzprismen

Ein in Abbildung 5.4 schematisch dargestellter nicht-kollinearer optisch-parametrischer Verstärker, dessen Aufbau sich an den Arbeiten von Riedle und Mitarbeitern orientiert [108-110] wird mit 200 μJ des vom CPA-2001 erzeugten Lichts betrieben. Der Strahldurchmesser des größten Teils des zum Pumpen des NOPAs verwendeten Laserlichtes wird mit zwei Quarzlinsen ($L3$, $f = 150\text{ mm}$, $L4$, $f = -50\text{ mm}$) von ca. 2.4 cm auf ca. 0.8 cm mit einem Teleskop verkleinert. Anschließend wird das Laserlicht in einem Lithiumtriborat-Kristall (LBO , $\theta = 29.8^\circ$) frequenzverdoppelt. Die Energie der Pulse beträgt ca. 85 μJ und ihre Zentralwellenlänge ist 387.5 nm. Diese Laserpulse gelangen durch eine Linse ($f = 250\text{ mm}$) in einen β -Barium-Borat-Kristall (BBO , $\theta = 32^\circ$). Der Fokus des Laserstrahls liegt ungefähr 10 cm vor diesem Kristall, um die Intensität unterhalb dessen Zerstörungsschwelle zu halten. In einem Winkel von etwa 6.3° zu dem Laserstrahl wird zusätzlich der Strahl eines Weißlichtkontinuums als Seedwelle in den BBO-Kristall fokussiert. Der Winkel innerhalb des Kristalls zwischen Pump- und Seedstrahl beträgt 3.7° .

Das Licht für die Erzeugung des Weißlichtkontinuums wird mit einem Quarzkeil (QK) durch Oberflächenreflektion vor dem Teleskop vom Hauptstrahl abgetrennt und mit einer Quarzlinse ($L1$, $f = 50\text{ mm}$) in ein 2 mm dickes Saphirsubstrat fokussiert. Ein gleichmäßiges und stabiles Weißlichtkontinuum („single filament“) [111] lässt sich durch Variation des Abstandes zwischen Linse und Substrat einstellen. Das erzeugte Licht wird über eine weitere Quarzlinse ($L2$, $f = 40\text{ mm}$) und die Verzögerungsstrecke 1 (Bühne 1 in Abbildung 5.4) in den BBO-Kristall fokussiert. Das Weißlichtkontinuum besitzt eine lineare Gruppengeschwindigkeitsdispersion (linearer Chirp). Jeweils der Teil des Weißlichts, der zeitlich mit dem Pumpstrahl überlappt, wird verstärkt, da die Phasenanpassungsbedingung für einen breiten Spektralbereich erfüllt ist (siehe Abschnitt 5.1.2.1). Weil außerdem die Gruppengeschwindigkeit v_p des Pumpstrahls kleiner ist als die der Seed- bzw. Signalwelle, überlappen je nach zurückgelegtem Weg innerhalb des Kristalls verschiedene Wellenlängen des Weißlichtkontinuums mit dem Pumpimpuls. Somit wird ein breites Spektrum verstärkt. Abhängig vom Chirp des Seedstrahls wird in nichtkollinearer Anordnung in einem längerem Kristall daher ein breiteres Spektrum verstärkt als in einem kurzen. Im Anschluss an die parametrische Verstärkung beträgt die Pulsenergie ungefähr 8 μJ . Die Linse $L5$ ($f = 400\text{ mm}$) hinter dem BBO-Kristall kollimiert den erzeugten Laserstrahl.

Die Zentralwellenlänge des NOPA Spektrums wird mit der Bühne 1 eingestellt, indem

die gewünschte Frequenz des Seedstrahls mit dem Pumpstrahl in der Mitte des BBO-Kristalls zeitlich überlappt. Da der Chirp der erzeugten Pulse nahezu linear ist, können diese mit einem Prismenpaar zeitlich komprimiert werden [92]. Der Laserstrahl wird hierzu durch ein Quarzprisma (PR1) über eine variable Dispersionsstrecke (Bühne 2) geleitet, die den Strahl auf ein zweites Quarzprisma (PR2) lenkt. Die nachfolgende, aus zwei Spiegeln bestehende Anordnung S1, reflektiert den Strahl einen Zentimeter tiefer wieder auf dem umgekehrten Weg auf den Spiegel S2 zurück. Von hier wird der nun zeitlich komprimierte Laserpuls in das Experiment geleitet.

In Abbildung 5.5 a.) sind Spektren des eingesetzten NOPAs mit unterschiedlichen Zentralwellenlängen zu sehen. Diese wurden mit einem Polychromator (Monochromator: Bausch & Lomb $f = 100$ mm, Gitter 1350 l/mm; Detektor S3901, Hamamatsu) aufgenommen. In den Experimenten wurde die Breite des Laserspektrums an das Absorptionsspektrum des jeweils verwendeten Farbstoffs mit einer Quarzplatte (QP) angepasst. Diese bestimmt je nach Dicke die Größe des Chirps des zum Seeden verwendeten Lichtes und damit die Breite des verstärkten Spektrums im BBO Kristall. Die ohne diese Quarzplatte gemessenen Autokorrelationen zu den in Abbildung 5.5 a.) gezeigten Spektren besitzen eine mittlere Breite von 20 fs und sind in Abbildung 5.5 b.) dargestellt.

Abbildung 5.5: a.) Spektren des NOPAs. b.) Zugehörige Autokorrelationen.

Die Autokorrelationen sind zur besseren Unterscheidbarkeit auf der Zeitachse gegeneinander verschoben.

5.2 Messaufbau

Für die Photon-Echo-Messungen wurden zwei unterschiedliche Versuchsaufbauten verwendet. Die zunächst beschriebene Dreiecksgeometrie liefert absolute Werte für den Peakshift und zeigt damit auch statische Inhomogenitäten an, während sich die sogenannte Boxchargeometrie durch eine höhere relative Messgenauigkeit auszeichnet. Mit dieser Methode kann der Peakshift allerdings nur relativ bestimmt werden.

5.2.1 Aufbau der Dreiecksgeometrie

Den prinzipiellen Aufbau in der Dreiecksgeometrie zeigt Abbildung 5.6 [76]. Der vom NOPA kommende Strahl wird mittels dreier Strahlteilerwürfel (BS) (Linus Photonics, Reflektion 50 %, Al Beschichtung, Kantenlänge 5 mm) in drei gleich intensive Strahlen 1 – 3 aufgespaltet. Die Strahlen 1 und 2 (markiert durch Zahlen in Abbildung 5.6) werden über jeweils eine variable Verzögerungsstrecke (Translationsbühnen 1 und 2, Nanomover, Nanomotion II, Melles Griot) geleitet, während Strahl 3 eine feste Verzögerungsstrecke durchläuft. Die nachfolgende Linse L1 fokussiert die drei Strahlen in die Messzelle (QS-165-1 mm, Hellma). Die räumliche Anordnung der drei Strahlen mit den Wellenvektoren k_1 bis k_3 auf der Linse ist im Oval der Abbildung 5.6 eingezeichnet. Der zeitliche Abstand zwischen den Pulsen der Strahlen 2 und 3 wird mit t_{23} bezeichnet, der zwischen den Pulsen der Strahlen 1 und 2 mit t_{12} . Beide Translationsbühnen erlauben minimale Schrittweiten von 10 nm und einen maximalen Verstellweg von 25 mm. Ein Computerprogramm, welches die Programmierplattform HPVEE [112] nutzt, steuert die Nanomover. In späteren Messungen konnte der zur Verfügung stehende Messbereich auf ca. 300 ps erweitert werden, in dem die Laserstrahlen 1 und 2 je zweimal über Spiegel auf den zugehörigen variablen Translationsbühnen geleitet wurden. Der Übersichtlichkeit wegen sind diese Details aber nicht in Abbildung 5.6 und der im Rahmen der Boxchargeometrie diskutierten Abbildung 5.7 eingezeichnet.

Die nichtkollineare Einstrahlung der Laserpulse erzeugt elektromagnetische Felder (z.B. Transient Grating, Photon-Echo) in den durch die Wellenvektoren:

$$k_4 = k_3 + k_2 - k_1 \quad k_4' = k_3 - k_2 + k_1$$

$$k_5 = 2 \cdot k_1 - k_2 \quad k_5' = 2 \cdot k_2 - k_1$$

Gleichung 5.6

bestimmten Raumrichtungen. Je nach zeitlicher Reihenfolge der eingestrahlt Pulse mit Wellenvektoren k_1 bis k_3 wird in den Richtungen k_4 , k_4' , k_5 , k_5' ein Photon-Echo erzeugt. In Richtung k_4 und k_4' wird das Drei-Puls-Echo für verschiedene t_{23} abgestrahlt, in Richtung k_5 und k_5' ein Zwei-Puls-Echo, das einem Drei-Puls-Echo für $t_{23} = 0$ entspricht. Da die erzeugten Felder auf Grund der Phasenanpassungsbedingungen räumlich getrennt sind, können sie einzeln detektiert werden (Spiegel S1 – S4, Detektoren PM1 – PM4 in Abbildung 5.6).

Abbildung 5.6: Experimenteller Aufbau des Photon-Echo-Experiments in Dreiecksgeometrie ;

2PE, 3PE = Photomultiplier zur Messung der Echosignale;

BS = Strahlteilerwürfel; L1 = Linsen mit $f = 300$ mm; S1 - S4 = Spiegel;

k_1 - k_3 = Laserstrahlenanordnung auf der Linse;

k_4 - k_5 = erzeugte Laserstrahlen.

In den durchgeführten Experimenten wurde die Pulsenergie des NOPAs durch nachfolgende Neutralglasfilter oder geschlossene Lochblenden auf 10 bis 20 nJ abgeschwächt. Die dem Experiment zugeleitete Pulsenergie wird zwischen den Messungen mit einer, anhand eines Leistungsmessgeräts geeichten Photodiode überwacht. Um eine gleichbleibende Anpassung des NOPA Spektrums an das Absorptionsspektrum des Farbstoffes zu gewährleisten, wurde ersteres mit dem Polychromator (siehe Abschnitt 5.1.2.2) ständig kontrolliert.

5.2.2 Aufbau der Boxchargeometrie

In dem Versuchsaufbau in der Boxchargeometrie [113] wird der vom NOPA kommende Laserstrahl mittels sechs 50% Strahlteilerwürfel (BS) in sieben gleich intensive Laserstrahlen aufgeteilt. Drei dieser Strahlen (Abbildung 5.7, Strahlen 1-3) werden wie in der Dreiecksgeometrie über zwei variable und eine festen Verzögerungsstrecke geleitet und dann mit der Linse L1 ($f = 300$ mm) in die Zelle fokussiert. Dieser Teil des Aufbaus wird als Probenteil bezeichnet. Das Oval in Abbildung 5.7 zeigt die Anordnung der Laserstrahlen auf der Linse L1. Das Photon-Echo wird in Richtung k_4 beobachtet. Die Phasenanpassung für k_4 ist gleich der in der Dreiecksgeometrie (Gleichung 5.6). k_1 bis k_4 zeigen in die Ecken eines Quadrates. Gleichzeitig mit der Messung im Probenteil erfolgt im Referenzteil die Aufnahme einer Autokorrelation (Abbildung 5.6). Die Linse L2 ($f = 300$ mm) fokussiert die Strahlen 4 und 5 in einen BBO-Kristall. Sie werden über die gleichen Translationsbühnen wie die Strahlen 1 und 2 geleitet, so dass der einmal eingestellte Zeitunterschied zwischen dem 3-Puls-Echo-Signal und der Autokorrelation im Referenzteil konstant bleibt. Von den beiden verbleibenden Strahlen wird einer für die Energiekontrolle mittels einer Photodiode verwendet, der andere Strahl für die Überwachung des Spektrums mit dem Polychromator.

Bei Messungen in der Boxchargeometrie lässt sich der Peakshift zur Autokorrelation (AK) nur relativ bestimmen, da sich in der Praxis der Laufzeitunterschied zwischen beiden Messarmen nicht vollständig beseitigen lässt. Bei der Einstellung des Nullpunktes wird ein BBO-Kristall anstelle der Probe im Probenteil eingebaut, so dass eine Autokorrelation gemessen werden kann. Der zeitliche Unterschied zwischen den beiden Autokorrelation wird minimiert. Dies ist mit der Genauigkeit von einer Femtosekunde möglich. Durch Einsetzen der Probe verändert sich jedoch der Nullpunkt geringfügig.

Abbildung 5.7: Boxcargeometrie; PM = Photomultiplier zur Messung des 3-Puls-Echos;
 PD = Photodiode zur Messung der Autokorrelation (Auto) und der Energie;
 BS = Strahlteilerwürfel; L1, L2 = Linsen mit $f = 300 \text{ mm}$;
 k1 - k3 = Laserstrahlenanordnung auf der Linse

5.2.3 Vergleich zwischen Dreiecks- und Boxchargeometrie

Die Dreiecksgeometrie misst im Gegensatz zur Boxchargeometrie den absoluten Peakshift. Da hierbei nicht der Peakshift nur bis auf eine Konstante (wie in der Boxchargeometrie) bestimmt ist, gelingt es auch Zeitkomponenten zu bestimmen, deren Abklingzeit die experimentell maximale Verzögerungszeit erreichen. Von Nachteil ist, dass beide Echo-Signale mit Wellenvektoren k_4 und k_4' für große t_{23} in ihrer Intensität abnehmen. Dies erfordert eine besonders sorgfältige Auswertung, siehe Kapitel 5.3. Ebenso bereitet die genaue Einstellung dieser Geometrie Probleme, so dass der Nullpunkt, der durch die beiden Zwei-Puls-Echos in den Richtungen der Wellenvektoren k_5 und k_5' ermittelt wird, selten dem Nullpunkt der Drei-Puls-Echos entspricht.

Der Vorteil der Boxchargeometrie ist die effektivere Rauschunterdrückung bei der Peakshiftbestimmung, da ein Bezugspunkt aus der mit gutem Signal - Rauschverhältnis unabhängig von t_{23} aufgenommenen Autokorrelation bestimmt wird (siehe Kapitel 5.3). Außerdem bereitet die Einstellung der Geometrie nicht die geschilderten Probleme der Dreiecksgeometrie.

Weitere Unterschiede in den beiden beschriebenen Aufbauten ergeben sich aus der Anzahl der Laserstrahlen und benötigten Detektoren. Die Boxchargeometrie benötigt fünf Strahlen und zwei Detektoren, die Dreiecksgeometrie drei Strahlen und vier Detektoren. Insbesondere in Experimenten, wo die zur Verfügung stehende Laserleistung geringer (z.B. im infraroten oder blauen Spektralbereich), die im Experiment benötigte aber größer ist als im vorliegenden Fall, kann sich der Einsatz des Aufbaus in Dreiecksgeometrie als vorteilhaft erweisen.

5.3 Experimentsteuerung und Detektion der Signale

Die Durchführung der Messungen erfordert die Aufnahme der Photon-Echo Signale in Abhängigkeit der Verzögerungszeiten t_{12} und t_{23} . Die Ansteuerung der Translationsbühnen der Verzögerungsstrecken erfolgt mit einem in HPVEE [112] geschriebenen Computerprogramm. Dieses Programm fährt die Bühnen 1 und 2 zu einer festen Verzögerungszeit t_{23} und führt dort eine Photon-Echo-Messung für verschiedene Zeiten t_{12} durch. Die Signale werden mit Photodioden (S1336-8BQ, Hamamatsu) beziehungsweise Photomultipliern (R928, Hamamatsu, 7 Dynoden beschaltet, Hochspannung 700 V) mit nachfolgenden Integratorschaltungen beobachtet und mit einer A/D-Wandlerkarte (DT 3016; 16 Bit, Data Translation) digitalisiert. Um das Signal - Rauschverhältnis zu verbessern, wurden zu jeder Verzögerungszeit t_{23} zehn bis fünfzehn Messkurven addiert. So erhaltene typische Photon-Echo-Intensitäten als Funktion von t_{12} sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

Die Angabe der Peakshifts erfordert eine genaue Bestimmung der Zeit t_{12} , bei der die Photon-Echo Intensität maximal wird. Dazu werden die in Abbildung 5.8 repräsentativ dargestellten Messkurven geglättet, in dem jedem Datenpunkt der Mittelwert der Intensität aus den 15 am nächsten liegenden Punkten auf jeder Seite zugeordnet wird. Anschließend wird der Bereich des Signals, der eine normierte Intensität größer als 0.7 aufweist, an ein Polynom dritten Grades angepasst und die Zeit t_{12} des Maximums des Polynoms bestimmt. Diese Bestimmung des Maximums (Peak) und der anschließend ermittelten Verschiebung der Maxima als Funktion der Zeit t_{23} (Peakshift) wird mit einem in Matlab [114] geschriebenen Programm durchgeführt.

In der Boxcargeometrie bestimmt sich der Peakshift eindeutig, aber nicht absolut, aus der Differenz der Zeiten maximaler Photon-Echo-Intensität (Wellenvektor k_4) und Autokorrelationssignal. Wie bereits erwähnt, ist der Peakshift in dieser Anordnung nur bis auf einen konstanten Wert in der Größenordnung von 1 fs festgelegt. Daher wurden alle Werte, die mit dieser Anordnung gemessen wurden, um einen konstanten Betrag korrigiert. Im allgemeinen wurde der Peakshift für $t_{23} = 300$ ps gleich Null gesetzt.

Abbildung 5.8: Photon-Echo-Signale (DiDC₁₈ in DMPC) in Abhängigkeit von t_{12} :

a.) Dreiecksgeometrie und b.) Boxchargeometrie; Auto = Autokorrelation;

k_4 , k_4' , k_5 , k_5' = Echosignale in den jeweiligen Richtungen.

Im Fall der Dreiecksgeometrie kann der Peakshift allerdings auf zwei Arten bestimmt werden. Zum einen ist er gleich der Hälfte des Abstandes zwischen den beiden Maxima der 3-Puls-Echo-Signale k_4 und k_4' . Zum anderen lässt er sich aus dem Abstand des 3-Puls-Echo-Maximums zum Nullpunkt ermitteln. Dieser Nullpunkt liegt exakt auf der Hälfte des zeitlichen Abstands der beiden Maxima der Signale in Richtung k_5 und k_5' .

5.4 Temperaturstabilität im Experiment

5.4.1 Rotationszelle

Die zu untersuchende Probe wird in eine thermostatisierbare Küvette (165-QS-1mm, Hellma) eingefüllt. Damit es zu keiner lokalen Erhitzung im Fokus der Laserstrahlen oder einem Ausbleichen der Probe kommt, wird die Zelle bewegt. Eine motorbetriebene speziell konstruierte Halterung (siehe Abbildung 5.9) sorgt für eine exzentrische Bewegung der Zelle um den Fokus der Laserstrahlen mit ungefähr 20 Hz, und einem Hub von 2 mm, so dass sich der Fokus in der Zelle mit einer Geschwindigkeit von 250 mm/s bewegt. Bei der verwendeten Repetitionsrate von 1 kHz darf der Fokusbereich daher bis zu 250 μm betragen. Dies ist bei den Experimenten gegeben, so dass jeder Laserpuls einen neuen Volumen in der Probe trifft.

Abbildung 5.9: Zellhalterung mit Rotationsvorrichtung

Die Temperatur wird mit einem Thermostaten (RCS6, Lauda) eingestellt und stabilisiert. Eine genauere Temperaturmessung in der Zelle erfolgt mit einem Thermoelement (Pt100) mit einer Genauigkeit von 0.1 °C.

5.4.2 Untersuchung der Erwärmung der Probe im Experiment

Abbildung 5.10: Temperaturmessung im Fokus

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Membrangrenzschicht auf die Dynamik des Wassers untersucht. Dazu wurden auch Messungen in einem Temperaturbereich durchgeführt, der einen Phasenübergang innerhalb der Membran beinhaltet. Die Kenntnis der genauen Temperatur im Fokus, und ihrer Beeinflussung durch die eingestrahlt Laserstrahlen, ist daher unabdingbar.

Die Messung von Temperaturänderungen durch die drei eingestrahlt Laserpulse gelingt durch die Beobachtung der optischen Dichte der zu untersuchenden Probe. Hierzu wird in der Boxcaranordnung (Abbildung 5.7) der Strahl eines Helium-Neon-Lasers parallel so zu den drei anderen Strahlen justiert, dass alle Strahlen auf der Linse L1 ein Quadrat bilden. Dadurch überlappen alle vier Foki im selben Volumen der Probe. Die Intensität I des HeNe-Laserstrahls wird hinter der Zelle mit einer Photodiode nachgewiesen. Eine weitere Photodiode detektiert die mittels eines Strahlteilers ausgekoppelte relative Intensität I_0 des HeNe-Lichtes vor der Zelle. Aus den beiden Messgrößen I und I_0 bestimmt sich eine relative optische Dichte in Abhängigkeit der Temperatur. Das Ergebnis einer solchen Messung zeigt Abbildung 5.10.

Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass das Photon-Echo-Experiment die Temperatur im Fokus nicht beeinflusst: Die beiden Messkurven unterscheiden sich

innerhalb des Signal-Rausch-Verhältnisses nicht voneinander, wenn der Pumpstrahl ein- und ausgeschaltet wird. Eine geeignete Wahl der Zeitabstände t_{12} und t_{23} der eingestrahlten Laserpulse stellt sicher, dass kein Signal in der Detektionsrichtung des HeNe-Laserstrahls erzeugt wird.

Die hier aufgenommenen Änderungen der optischen Dichte bei 632 nm als Funktion der Temperatur sind mit unabhängig hiervon durchgeführten temperaturabhängigen Messungen des stationären Absorptionsspektrums von DiDC₁₈ in DMPC (Abbildung 5.10 blaue Kurve) konsistent. Zwischen 15 °C und 27 °C ergibt sich sogar eine gute Übereinstimmung.

5.5 Farbstoffsynthese

Für die Messungen wurden kommerziell erhältliche Farbstoffe und Lipide eingesetzt. Lediglich das 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyaninchlorid (DiC₁₈) wurde synthetisiert. Für die Herstellung waren drei Syntheseschritte notwendig (Abbildung 5.11). Edukte waren das p-Chlorobenzolsulfochlorid (1b) und der Stearylalkohol (1a). In der ersten Stufe wurde das Alkylierungsreagenz 4-Chlorobenzolsulfonsäure-octadecylester (2a) hergestellt. 2,3,3-Trimethyl-3H-indol (2b) wurde anschließend mit dem Produkt (2a) aus der ersten Reaktion alkyliert. Das so erhaltene 2,3,3-Trimethyl-1-octadecyl-3H-indolium-4-chlorbenzoat (3a) wurde durch eine Reaktion mit 3-Anilinoacrylaldehydanil (3b) zum DiDC₁₈ verbrückt. Eine detaillierte Versuchsdurchführung ist dem Anhang zu entnehmen.

Abbildung 5.11: Schematische Darstellung der dreistufigen Synthese von 1,1'-Di-octadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyaninchlorid

5.6 Probenmoleküle und Vesikelpräparation

Im Verlauf der Untersuchungen wurden zwei Farbstoffmoleküle und drei unterschiedliche Lipide eingesetzt. Als Lösungsmittel wurde Wasser verwendet.

Substanz	Hersteller/Lieferant	Reinheitsgrad
DMPC	Avanti, Fluka	>99%
DOPC	Avanti	>99%
DPPC	Avanti	>99%
Wasser	Merck	zweifach destilliert
DiDC ₁	Lambda Physik	ohne Angabe
DiDC ₁₈	eigene Synthese	mehrfach umkristallisiert

Tabelle 5.1

Die gekauften Substanzen wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das synthetisierte DiDC₁₈ wurde mehrfach umkristallisiert und in einer Kieselgelsäule gereinigt. Die Hersteller und Reinheitsgrade sind soweit bekannt in Tabelle 5.1 angegeben.

5.6.1 Farbstoffe

Der Chromophor der Farbstoffe besteht in beiden Fällen aus einer Indodicarbocyanineinheit. In Abhängigkeit der zu untersuchenden Zielumgebung bestehen die Alkylgruppen am Stickstoff aus kurzen oder langen aliphatischen Ketten. Für die Untersuchungen der Membrangrenzschicht wird eine lange gesättigte Alkylkette mit 18 Kohlenstoffatomen verwendet. Der so erhaltene Farbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyaninchlorid (DiDC₁₈) ist aufgrund der langen aliphatischen Kette mit ihrem unpolaren Charakter wasserunlöslich. Die Ketten des Farbstoffs dienen als Anker für die Membrandoppelschicht. Der Chromophor befindet sich in diesem Fall direkt an der Grenzschicht, wie Fluoreszenz-Polarisations-Messungen [115, 116] gezeigt haben. Des Weiteren haben Untersuchungen gezeigt, dass dieser Farbstoff die nach außen gerichtete Seite der Doppelschicht der Vesikel bevorzugt [117].

Beim zweiten eingesetzten Farbstoff ist eine Methylgruppe an das Stickstoffatom gebunden. Das 1,1',3,3',3',3'-Hexamethylindodicarbocyaniniodid (DiDC₁ oder HIDCl) ist daher wasserlöslich und wird bei den Photon-Echo-Experimenten in reinem Wasser verwendet.

Abbildung 5.12: Indodicarbocyanine DiDC₁ und DiDC₁₈

Die stationären Absorptions- und Emissionsspektren beider Farbstoffe werden in Kapitel 6.1 gezeigt und diskutiert. Die Absorptionsspektren wurden mit einem Shimadzu UV-160 Spektrometer gemessen. Die Fluoreszenzspektren wurden dagegen mit einem Spex Fluorolog III der Firma Jobin-Yvon bestimmt.

5.6.2 Lipide

Die eingesetzten Lipide gehören zu den in der Natur vorkommenden Lipiden und dienen daher in reiner Form als Modellsysteme. Sie gehören der großen Gruppe der 1,2-Diacyl-sn-Glycero-Phosphocholine an. Mit ihren zwei Alkylketten und der polaren Kopfgruppe ähneln sie in ihrer Polarität dem DiDC₁₈. Die verwendeten Lipide besitzen gesättigte Alkylketten mit 14 (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-Phosphocholine;

DMPC) und 16 (1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-Phosphocholine; DPPC) Kohlenstoffatomen. Das dritte Lipid dagegen besitzt eine cis-Doppelbindung am 9. Kohlenstoffatom bei insgesamt 18 Kohlenstoffatomen (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-Phosphocholine; DOPC). Alle Lipide haben eine identische Phosphocholin-Kopfgruppe.

Abbildung 5.13: Glycero-phosphocholine: DMPC, DOPC, DPPC

5.6.3 Vesikelherstellung

In den Photon-Echo-Experimente wurden Lösungen mit einer Lipidkonzentration von 20 mmol/l bzw. 10 mmol/l verwendet und mit DiDC₁₈ markiert. In diesen Lösungen besteht ein Verhältnis zwischen den Lipiden und dem Farbstoff DiDC₁₈ von 1000:1 bzw. 500:1.

Die Herstellung der mit Farbstoff markierten Vesikel erfolgte in mehreren Schritten. In einem kleinen Becherglas wird zunächst die notwendige Menge Lipid eingewogen. Anschließend wird eine Dichlormethanolösung des Farbstoffs DiDC₁₈ mit bekannter Konzentration hinzugefügt. Das so erhaltene Gemisch wird bis zum vollständigen Lösen der Lipide geschüttelt. Für DPPC und DOPC ist zum Lösen eine Zugabe von geringen Mengen Methanol erforderlich. Nun wird das Lösungsmittel unter einer Stickstoffatmosphäre verdampft. Zur vollständigen Beseitigung von

Lösungsmittelresten wird das Becherglas mit der Substanz über einen Zeitraum von 4 - 6 Stunden in einem Exsikkator aufbewahrt. Der Exsikkator wird während dieser Zeit an eine Ölpumpe angeschlossen. Die mit DiDC₁₈ markierten Lipide werden anschließend mit Wasser versetzt und mit einem Magnetrührer gerührt bis sich eine gleichmäßige Dispersion bildet. Diese Dispersion wird extrudiert. Der eingesetzte Liposo-Fast Extruder von der Firma Avestin, Inc. besteht aus zwei Glasspritzen und einem Metallzwischenstück, welches zwei Plastikteile zusammenhält. Die Plastikteile dienen der Fixierung eines Polycarbonatfilters.

Extrudiert wird, indem eine Spritze mit Substanz gefüllt wird. Beide Spritzen werden an die Plastikfilterhalterungen angeschraubt und die Emulsion wird durch die Membran von einer Spritze in die andere gepresst. Dieser Vorgang wird 19 mal wiederholt. Die so erhaltene Lösung enthält Vesikel in einer von der Porengröße des Filters abhängigen Größenverteilung. Es wurden 100 nm Filter eingesetzt. Die resultierende Größenverteilung ist damit bei 80 nm zentriert [17].

Bevor die präparierten Lösungen in den Experimenten eingesetzt werden, wird die gelöste Luft durch ein schwaches Vakuum beseitigt. Die so gewonnene Probe ist nur einige Wochen stabil. Aus diesem Grund wurde direkt vor der Messung extrudiert.

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der Zeitskalen und molekularen Mechanismen der dynamischen Solvation an Phospholipid-Wasser-Grenzschichten.

Als Sonde für die dynamische Solvation in diesem System wird ein Indocarbocyaninfarbstoff verwendet, dessen Chromophor an der Wasser-Lipid-Grenzschicht lokalisiert und über langkettige Alkylreste im hydrophoben Kern der Membran nicht-kovalent verankert ist (siehe Abbildung 6.1) [115-117].

Abbildung 6.1: Schematische Abbildung einer Lipiddoppelschicht (schwarz) mit dem Sensorfarbstoff DiDC₁₈ (grün) und umgebenden Wasserdipolen (rot/blau)

Für eine detaillierte Analyse der Solvation an Phospholipid-Wasser-Grenzschichten ist es wichtig, zwischen grenzschicht-spezifischen Dynamiken und denen der wässrigen Volumenphase unterscheiden zu können. Aus diesem Grund wird zunächst die Solvationsdynamik des Chromophors in reinem Wasser (also in Abwesenheit der Lipid-Grenzschicht) ermittelt.

In der wässrigen Volumenphase dient wiederum der Indocarbocyaninfarbstoff, dessen langkettige Alkylreste durch Methylgruppen substituiert sind, als Sonde für Solvationsdynamiken. Diese einfache Substitution verbessert die Wasserlöslichkeit des ansonsten identischen Chromophors.

6.1 Allgemeine Untersuchungen der Farbstoffe und der Lipidlösungen

a) Stationäre Absorptions- und Emissionsspektren

In Abbildung 6.2 sind die stationären Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Cyaninfarbstoffe abgebildet. Die Spektren der Farbstoffe in reinem Wasser und an der DMPC-Wasser-Grenzschicht unterscheiden sich nur geringfügig. Im Vergleich zu Wasser sind die Spektren von DiDC₁₈ an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht um 266 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Diese Rotverschiebung lässt sich durch die im Vergleich zum reinem Wasser höhere lokale Dichte an der Grenzschicht erklären.

Abbildung 6.2: Stationäre Absorptions- (blau) und Emissionsspektren (rot) aufgetragen gegen Wellenzahlen in reziproken Zentimetern bzw. der Wellenlänge λ in nm:
a.) DiDC₁ in Wasser, b.) DiDC₁₈ in DMPC/Wasser.

Die Form der Absorptions- und Emissionsspektren ändert sich dagegen nicht und verdeutlicht, dass das elektronische Übergangsmoment ausschließlich auf dem Indocarbocyaninchromophor ruht und nicht wesentlich von den Alkylsubstituenten beeinflusst wird. Selbst die Stokes-Verschiebung von 685 cm^{-1} ist für beide Farbstoffe gleich. Dies weist auf eine identische Reorganisationsenergie hin.

Ein Charakteristikum der Indocarbocyaninfarbstoffe ist die ausgeprägte Neigung zur Aggregatbildung, die die optischen Eigenschaften des Farbstoffes in dramatischer Weise beeinflusst [147, 148]. Die sich bildenden Aggregate werden in der Literatur J-Aggregate genannt. Diese Oligomere zeigen im Vergleich zum Monomer ein stark rotverschobenes, schmales Absorptionsspektrum, welches für eine exzitonische Kopplung im Grenzfall des „motional narrowings“ des J-Aggregates typisch ist [120]. Bei tiefen Temperaturen macht sich neben einer schmalen Absorptionsbande der J-Aggregate eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer bemerkbar, die ihre Ursache in kooperativer Emission („superradiance“) hat. Diese Abstrahlung steht in direkter Beziehung zur Anzahl der miteinander koppelnden Monomere [121].

Die oben erwähnten Eigenschaften solcher J-Aggregate konnten bei den durchgeführten Experimenten in Wasser und an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht nicht beobachtet werden. Die Formstabilität der Spektren und die Abwesenheit einer rotverschobenen Exzitonenresonanz im Speziellen belegt eine vernachlässigbare Aggregation.

b) Kalorimetrische Messungen der Phasenübergänge der reinen und der markierten Vesikel

In Abbildung 6.3 sind die Wärmekapazitäten der Vesikellösungen von DMPC und DPPC gegen die Temperatur T aufgetragen. Neben den reinen Lipidlösungen (schwarze Kurven) sind auch die Wärmekapazitätsmessungen von den mit DiDC₁₈ markierten Vesikellösungen abgebildet (rote Kurven). Anhand der Wärmekapazität sind die Phasenübergangstemperaturen des Vor- und Hauptphasenübergangs leicht zu bestimmen. Die Temperatur für den Hauptphasenübergang wird anhand des bei der höheren Temperatur gelegenen Maximums der Wärmekapazität ermittelt. Der Vorphasenübergang befindet sich bei deutlich tieferen Temperaturen und ist daher lediglich in der Einblendung des jeweiligen Graphen (Abbildung 6.3) dargestellt. Seine Temperatur entspricht der Temperatur am Wendepunkt der Wärmekapazität in diesem Bereich. Bei unmarkiertem DMPC ergibt sich eine Vorphasenübergangstemperatur von 11.3°C . Nach Markierung mit dem Farbstoff liegt der Übergang bei

10.8°C. Der Hauptphasenübergang findet dagegen bei einer Temperatur von 23.9°C (unmarkiertes DMPC) bzw. 23.7°C (markiertes DMPC) statt.

Bei DPPC verschieben sich die Phasenübergänge auf Grund der längeren aliphatischen Ketten zu höheren Temperaturen. Die Messungen ergeben Phasenübergangstemperaturen von 33.0°C und 41.2°C für unmarkiertes DPPC sowie 32.3°C und 41.1°C für markiertes DPPC. Diese Temperaturen entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten [122].

Abbildung 6.3: Messungen der Wärmekapazität c_p als Funktion der Temperatur im Bereich der Phasenübergänge von DMPC- und DPPC-Vesikeln mit (rot) und ohne (schwarz) DiDC₁₈ Marker

Eine Wärmekapazitätsmessung unilamellarer Vesikel von DOPC liefert eine Hauptphasenübergangstemperatur von -18°C (nicht abgebildet).

Die Veränderung der Kurvenform der Wärmekapazität von Lipidmembranen durch den Farbstoff lässt keine eindeutige Interpretation zu, da bislang unklar ist, woher beispielsweise die zwei Maxima beim Hauptphasenübergang herrührt. Vermutet wird ein struktureller Übergang in den Vesikeln [123]. Fremdmoleküle könnten diesen Übergang beschleunigen und die Maxima zu einem einzelnen Maximum verschmelzen lassen.

Die Position des Phasenübergangs ist dagegen von größerer Bedeutung. Eine Verschiebung des Hauptphasenübergangs in Abhängigkeit des Farbstoffes ist bekannt und wird mit einer Bevorzugung des Farbstoffes für eine der beiden Phasen erklärt. Ein zu tieferen (höheren) Temperaturen verschobener Hauptphasenübergang ist bei Farbstoffen zu beobachten, deren Löslichkeit in der gelförmigen (flüssig-kristallinen) Phase höher ist als in der flüssig-kristallinen (gelförmigen) Phase [124-126]. Insgesamt werden die Phasenübergangstemperaturen der Vesikel durch den Farbstoff DiDC₁₈ nur unwesentlich verändert.

c) Temperaturabhängige Messungen der optischen Dichte

Die Absorptionsspektren von DiDC₁ in reinem Wasser (siehe Abbildung 6.4) verändern sich durch Variation der Temperaturen nur wenig. Das Verhalten der stationären Absorptionsspektren bei steigender Temperatur ist mit Pfeilen angedeutet. Während sich die Zunahme der optischen Dichte an der roten Flanke des Absorptionsspektrums durch thermische Anregung erklären lässt, ist die genaue Ursache für die Abnahme der optischen Dichte in den beiden anderen markierten Bereichen nicht bekannt.

Abbildung 6.4: Absorptionsspektren von DiDC₁ in reinem Wasser in Abhängigkeit der Temperatur im Bereich von 3°C – 50°C

Im Gegensatz zum Farbstoff zeigt das Absorptionsspektrum der reinen DMPC- und DPPC-Vesikel eine deutliche Temperaturabhängigkeit (siehe Abbildung 6.5). Beide Lösungen wurden mit identischer Konzentration von 20 mmol/l hergestellt. Die Porengröße des Extrudierfilters war 100 nm und die Schichtdicke der Messzelle betrug 1 mm. Trotz identischer Präparation beider Lösungen unterscheiden sich die Messergebnisse der beiden Proben deutlich voneinander.

Abbildung 6.5: Temperaturabhängige Messungen der optische Dichte von extrudierten
a.) DMPC- b.) DPPC-Vesikeln mit einer Konzentration von 20 mmol/l:
(blau: gelförmige Phase; grün: zackige Phase; rot: flüssig-kristalline Phase)

Die optische Dichte beider Lipidlösungen nimmt zu kürzeren Wellenlängen stark zu und sinkt mit steigender Temperatur.

Die in Abbildung 6.5 a.) dargestellten Spektren der DMPC-Vesikeln zeigen eine im Vergleich zu den DPPC-Vesikeln geringere Temperaturabhängigkeit. Die Zunahme der optischen Dichte beträgt im Wellenlängenbereich von 1100 nm bis 400 nm maximal 0.1. In der Einblendung ist die Absorption bei einer festen Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm gegen die Temperatur aufgetragen. Bei der Temperatur des Hauptphasenübergangs ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) ist ein deutlicher Sprung zu beobachten, während bei

der Temperatur des Vorphasenübergangs ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) praktisch keine Änderung der Absorption zu erkennen ist.

Im Gegensatz zu DMPC-Vesikeln ist bei DPPC-Vesikeln eine Zunahme der optischen Dichte über den gesamten Spektralbereich zu beobachten. Sowohl der Vorphasenübergang als auch der Hauptphasenübergang der Vesikel ist mit einer verstärkten Abnahme der optischen Dichte bei Erhöhung der Temperatur verbunden (Abbildung 6.5 b.)). Die Veränderung der Absorption am Vorphasenübergang ist bei DPPC-Vesikeln im Gegensatz zu DMPC-Vesikeln besonders ausgeprägt.

Für das auffällige Temperaturverhalten der optischen Dichte der Vesikel, können verschiedene Erklärungsmodelle herangezogen werden. Im Falle einer elektronischen **Absorption** der Lipide gilt die folgende lineare Abhängigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$OD = -\log \frac{I}{I_0} \propto \text{Konzentration}, \quad \text{Lambert-Beersches Gesetz}$$

Gleichung 6.1

mit I_0 als eingestrahlte und I als transmittierte Lichtintensität. Bei Gültigkeit dieses Zusammenhangs würde eine Auftragung der optischen Dichte gegen die Konzentration eine lineare Abhängigkeit aufweisen.

Da die Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm eine mit der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes vergleichbare Größe aufweisen, könnte das auffällige Verhalten der optischen Dichte alternativ durch **Mie-Streuung** verursacht werden.

In diesem Fall gilt der folgende Zusammenhang [127]:

$$\frac{I_0 - I}{I_0} = -\sigma \cdot n_0 \cdot dx \quad \rightarrow \quad \frac{I_0 - I}{I_0} \propto \text{Konzentration} \quad \text{Mie-Streuung}$$

Gleichung 6.2

mit I_0 als eingestrahlte und I als transmittierte Lichtintensität. Die Parameter σ und n_0 beschreiben den Streuquerschnitt der Teilchen bzw. deren Anzahldichte (Konzentration). Der in der Lösung vom Licht zurückgelegte Weg wird mit dx bezeichnet.

Um zwischen diesen beiden Modellen unterscheiden zu können, wurden konzentrationsabhängige Messungen an DPPC-Vesikeln durchgeführt. Dabei betrug die Temperatur 24°C, während die Konzentration von 5 mmol/l bis 20 mmol/l variiert wurde. In Abbildung 6.6 a.) sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt, wobei farbstoffmarkierte Vesikellösungen verwendet wurden. Die Absorptionsbande zwischen 500 nm und 750 nm ist daher der elektronischen Resonanz des Indocarbocyaninfarbstoffes zuzuschreiben.

Abbildung 6.6: Konzentrationsabhängige Messung der Absorption von DPPC-Vesikeln bei einer Temperatur von 24°C:
 a.) Absorptionsspektren von DPPC (mit DiDC₁₈ markiert)
 b.) Auftragung der optischen Dichte (OD) bzw. des Verhältnisses $(I_0 - I)/I_0$ gegen die Lipidkonzentration bei $\lambda = 405$ nm

Eine Erhöhung der Vesikelkonzentration äußert sich in einer signifikanten Vergrößerung der optischen Dichte über den gesamten Wellenlängenbereich. Zur Unterscheidung der beiden Erklärungsmöglichkeiten ist in Abbildung 6.6 b.) die optische Dichte (Absorption) sowie das Verhältnis $(I_0 - I)/I_0$ (Streuung) als Funktion der Lipidkonzentration bei $\lambda = 405$ nm aufgetragen. Die Auftragung verdeutlicht, dass im

Gegensatz zur optischen Dichte die Größe $(I_0 - I)/I_0$ linear mit der Konzentration skaliert (Gerade in Abbildung 6.6 b.)). Es handelt sich bei dem beobachteten temperaturabhängigen Verhalten der optischen Dichte offensichtlich um Mie-Streuung.

Ein weiteres Indiz für Mie-Streuung ist das veränderte Spektrum der Vesikel, das sich bei der Benutzung eines Filters mit 30 nm Porendurchmesser bei ihrer Herstellung ergibt (ohne Abbildung). Die mit diesem Filter extrudierten Lösungen weisen ein in den ultravioletten Spektralbereich verschobenes Spektrum auf und der Untergrund im sichtbaren Spektralbereich nimmt ab.

Im Folgenden soll mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnis, dass es sich um Mie-Streuung handelt, das temperaturabhängige Verhalten der optischen Dichte der Vesikel erläutert werden. Nach dem Lichtstreuungsgesetz, bedeutet eine zunehmende optische Dichte bei gleichbleibender Konzentration n_0 und Weglänge dx eine Änderung des Streuquerschnitts σ . Eine einfache Erklärung dieser Temperaturabhängigkeit ist die Zunahme der Vesikelgröße, für die zwei Mechanismen in Frage kommen:

Eine Möglichkeit besteht in der Fusion von Vesikeln bei der sich zwei Vesikel irreversibel zu einem Vesikel zusammenschließen. Die in dieser Arbeit beobachtete Änderung der optischen Dichte mit der Temperatur ist allerdings reversibel, da sie beim Abkühlen als auch beim Erwärmen auftritt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht in der Aggregation von Vesikeln. Dabei stoßen zwei Vesikel zusammen und bleiben aneinander haften. Dieses Vesikelaggregat streut dementsprechend langwelligeres Licht stärker. In der Literatur ist dieser Prozess der Aggregatsbildung von Vesikeln als Adhäsion bekannt [128].

Die Markierung der Vesikel mit DiDC₁₈ führt zu den folgenden Beobachtungen. Die Maxima des Absorptionsspektrums des Farbstoffes in DMPC- und DPPC-Vesikeln verschieben sich mit zunehmender Temperatur zu höheren Frequenzen (Abbildung 6.7). Bei Überschreiten der Temperatur des Hauptphasenübergangs verschiebt sich das Absorptionsmaximum um 70 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums lässt sich mit einer Abnahme der lokalen Dichte am Ort des Chromophors mit steigender Temperatur erklären und ist im Hauptphasenübergang besonders ausgeprägt.

Auf die nachfolgend vorgestellten Photon-Echo-Experimente sollte diese Verschiebung vernachlässigbare Auswirkungen haben, da die Halbwertsbreite der in den Experimenten verwendeten Pulse ca. 800 cm^{-1} beträgt.

Abbildung 6.7: Position des Maximums der resonanten Absorption von DiDC₁ im Wasser und DiDC₁₈ in der Membran in Abhängigkeit der Temperatur.

d) Bestimmung der Schwingungsstruktur des Chromophors

Zur Bestimmung der Schwingungsstruktur des verwendeten Chromophors wurden Messungen sowohl in der Zeit- als auch in der Frequenzdomäne durchgeführt.

Ein geeignetes Werkzeug zur Analyse der Schwingungsstruktur in der Zeitdomäne stellt die in Kapitel 4.6 vorgestellte transiente-Gitter-Spektroskopie (TG) dar. Bei dieser Methode werden Schwingungswellenpakete im elektronischen Grundzustand des Chromophors präpariert, die auf die resonante, impulsiv-stimulierte Raman-Streuung zurückzuführen sind. Zusätzlich präpariert „impulsive“ Absorption des Anregungslichts Schwingungskohärenzen im elektronisch angeregten Zustand des Chromophors. Solche TG-Messungen sind äquivalent zu frequenz aufgelösten

Ramanstreuexperimenten, wobei letztere lediglich Schwingungsmoden des Grundzustandes nachweisen können.

Ramanstreuexperimente können resonant oder nicht-resonant durchgeführt werden. Bei den resonanten Experimenten wird unterschieden, ob der eingestrahlte Laserpuls eine geringere (pre) oder eine höhere Frequenz (post) als das Absorptionsmaximum des Farbstoffs aufweist.

Abbildung 6.8: Messung mit der transienten-Gitter-Spektroskopie an a.) DiDC₁₈ in DMPC und b.) DiDC₁ in Wasser.

In Abbildung 6.8 sind die Ergebnisse der transienten-Gitter-Messungen für DiDC₁₈ in DMPC (a.) und DiDC₁ in Wasser (b.) abgebildet. Die dargestellten Messungen weisen große Gemeinsamkeiten in der Schwingungsstruktur auf. Lediglich das zeitliche Ablinken der Signale innerhalb der ersten 2 ps erfolgt in Wasser deutlich schneller (Einblendung in Abbildung 6.8).

Nicht oszillatorische Anteile zu den in Abbildung 6.8 gezeigten Signalen werden zunächst subtrahiert. Anschließend wird durch Fouriertransformation das Schwingungsspektrum des Chromophors berechnet. Schwingungen mit Frequenzen kleiner als 80 cm⁻¹ wurden aus dem Spektrum entfernt, da sie auf Grund ihrer großen Amplitude höherfrequente Beiträge überdecken würden.

Bei den Spektren von DiDC₁ (Abbildung 6.9 a.) und b.)) ist eine qualitativ gute Übereinstimmung des TG-Spektrums mit dem frequenz aufgelösten Ramanspektrum bis hin zu 1400 cm⁻¹ zu beobachten. Beim Vergleich der Spektren ist zu beachten, dass die Amplituden des fouriertransformierten TG-Signals modifiziert sind, da die spektrale Breite des Laserpulses nicht berücksichtigt wurde. Abweichungen bezüglich der Amplituden resultieren weiterhin aus den unterschiedlichen Resonanzbedingungen beider Experimente.

Die gute Übereinstimmung zwischen frequenz aufgelöstem Spektrum und TG-Spektrum deutet darauf hin, dass die Schwingungsstruktur des Chromophors im angeregten Zustand nahezu identisch mit der des elektronischen Grundzustandes ist. Das Spektrum von DiDC₁₈ in DMPC weist eine große Ähnlichkeit zu dem Spektrum von DiDC₁ in Wasser auf. Die Frequenzen sind lediglich um 5 bis 10 cm⁻¹ zueinander verschoben. Der auffälligste Unterschied besteht jedoch in der Verschmelzung des Triplets bei 550 cm⁻¹ zu einem Singulett. Die Ursache für diesen Sachverhalt ist unbekannt, da die Schwingungsstruktur des Chromophors bisher nur teilweise zugeordnet wurde [129-131]. Eine mögliche Erklärung wäre die Aggregation des Farbstoffes innerhalb eines Vesikels, wie sie von Katsumata und Mitarbeitern tatsächlich beobachtet werden konnte [132]. Die Bildung von Aggregaten geht jedoch mit einer drastischen Veränderung des Absorptionsspektrums einher (siehe Kapitel 6.1 a.)). Diese Möglichkeit kann in dieser Arbeit jedoch ausgeschlossen werden, da eine Änderung des Absorptionsspektrums hier nicht beobachtet werden konnte.

Interessanterweise stimmen die Spektren von DiDC₁ in Wasser mit Ramanspektren desselben Chromophors in KBr-Proben quantitativ überein, wenn von einer zusätzlichen Bande knapp unterhalb der niedrigsten Bande des Triplets abgesehen wird [129].

Aufgrund dieser Aspekte ist es jedoch nicht einsichtig, weshalb das Spektrum von DiDC₁₈ in DMPC ein Singulett anstelle eines Triplets aufweist. Sato und Mitarbeiter konnten die 576 cm⁻¹-Komponente des Triplets von DiDC₁ der Deformationsschwingung der Polymethinkette zuordnen, welche die beiden Indolfragmente miteinander verbindet. Die Komponente bei 550 cm⁻¹ und 532 cm⁻¹ resultieren dagegen aus Biegeschwingungen der C-C(CH₃)₂-C-Gruppe im Indolfragment [129]. Die drastische Veränderung der Triplettstrukturen durch die

Verankerung des Chromophors an der Wasser-Lipid-Grenzschicht bleibt allerdings weiterhin unklar, da wie bereits erwähnt eine Aggregatbildung aufgrund der Absorptionsspektren ausgeschlossen werden kann.

Abbildung 6.9: a.) Post-resonantes Ramanspektrum von DiDC₁ in Ethanol;
b.) Frequenzamplitudenspektrum der TG-Messung von DiDC₁ in Wasser;
c.) Frequenzamplitudenspektrum der TG-Messung von DiDC₁₈ in DMPC.

6.2 Zwei-Puls-Echo-Messungen (2-PE)

Um einen Überblick zur Solvationsdynamik in polaren Flüssigkeiten zu erhalten, wurden zunächst Zwei-Puls-Echo-Experimente durchgeführt. Bei einer phänomenologischen Trennung der Zeitskalen in homogene (sehr schnelle) und inhomogene (sehr langsame) Fluktuationen der Umgebung sollte das zeitlich integrierte 2-Puls-Echo-Signal als Funktion der relativen Verzögerung t_{12} der beiden Pulse exponentiell mit der Zeitkonstanten $T_2/4$ abklingen (siehe Kapitel 4). In diesem sogenannten Bloch-Limit lassen sich die strukturellen Fluktuationen mit einer einzigen Zeitkonstanten beschreiben. Die Fluoreszenzlebensdauer kann beim betrachteten System vernachlässigt werden, da sie mit ca. 1 ns sehr viel größer ist als die Zeitskalen auf der das Echo abklingt [133, 134].

Abbildung 6.10: 2-PE-Signale von DiDC₁ in Wasser und von DiDC₁₈ an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht aufgetragen gegen die Zeit t_{12} zwischen den beiden eingestrahlt Pulsen.

In Abbildung 6.10 sind die gemessenen 2-PE-Signale von DiDC₁ in Wasser bzw. DiDC₁₈ in DMPC gegen die Verzögerung t_{12} aufgetragen. Des Weiteren wurde eine Autokorrelationsfunktion zur Festlegung des Nullpunktes hinzugefügt. Die linke Auftragung zeigt die Echointensität in einer linearen, die rechte in einer halb-logarithmische Darstellung. Die lineare Auftragung veranschaulicht, dass beide

Signale stark asymmetrisch und vom Nullpunkt verschoben sind. Eine exponentielle Anpassung (siehe rechts) liefert T_2 -Zeiten von 52 fs für den Farbstoff CiDC₁₈ in DMPC und 38 fs für DiDC₁ in Wasser. Da die Anpassung jedoch nur einen kleinen Bereich des Signals (Kreis in Abbildung 6.10) repräsentiert, geben die unterschiedlichen Phasenrelaxationszeiten T_2 lediglich einen ersten Hinweis auf verschiedene Solvatationsdynamiken in den betrachteten Umgebungen der Farbstoffe.

Dieses nicht-exponentielle Abklingen, sowie die Maximumverschiebung in Bezug auf den Nullpunkt, kann nur damit erklärt werden, dass sich das System nicht innerhalb des Bloch-Limits beschreiben lässt. Die geforderte Zeitskalentrennung ist somit nicht erfüllt. Dieses Ergebnis entspricht den in der Literatur dokumentierten Arbeiten über Solvatationsdynamik in polaren Flüssigkeiten [135-140].

Aufgrund der in den Zwei-Puls-Echo-Experimenten gewonnenen Ergebnisse, wurden zu einer detaillierten Klärung der Solvatationsdynamik Drei-Puls-Echo-Experimente durchgeführt.

6.3 Drei-Puls-Echo-Peakshift-Messungen (3-PEPS) von DiDC₁ in Wasser

Für die Charakterisierung der Solvationsdynamik in wässrigen Volumenphasen wird zunächst eine 3-PEPS-Messung bei 26°C vorgestellt. Anhand dieser Messung wird im folgenden Kapitel eine Zuordnung der verschiedenen Zeitskalen zu bestimmten molekularen Dynamiken von Wasser vorgenommen. Eine anschließende Frequenzanalyse der 3-PEPS-Daten gibt im Vergleich mit den durch Messungen des transienten Gitters erhaltenen Frequenzen einen weiteren Einblick in die Solvationsprozesse, die Chromophor spezifisch sind.

Die bei 26°C gemessene Solvationsdynamik wird im zweiten Teil des Kapitels durch 3-PEPS-Messungen bei weiteren Temperaturen ergänzt. Die zugeordneten Solvationsmoden werden durch diese Messungen auf ihre Temperaturabhängigkeit untersucht.

6.3.1 Analyse der Solvationskorrelationsfunktion des Wassers bei Zimmertemperatur

In Abbildung 6.11 sind die aus den 3-Puls-Echo-Experimenten gewonnenen Peakshifts in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit t_{23} aufgetragen. Die Auftragung mit der logarithmierten Abszisse (Abbildung 6.11 a.)) stellt den gesamten Messbereich von $t_{23} = 2$ fs bis $t_{23} = 300$ ps dar. Der Graph in Abbildung 6.11 b.) konzentriert sich demgegenüber auf den oszillatorischen Anteil des 3-Puls-Echo-Peakshifts im Bereich von $t_{23} = 0$ bis 3 ps. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Messpunkten t_{23} betragen 2 fs für den Kurzzeitbereich ($t_{23} = 0 - 30$ fs) und 10 fs für den oszillatorischen Abschnitt ($t_{23} = 0.03 - 3$ ps). Im Bereich von $t_{23} = 3 - 300$ ps werden 100 Messpunkte mit exponentiell anwachsender Verzögerung bestimmt. Es wurden drei individuelle 3-PEPS-Kurven in Boxcargeometrie gemittelt. Der Verlauf der Peakshifts kann mit drei Exponentialfunktionen und einer Gauß-Funktion gemäß Gleichung 6.3 angepasst werden:

$$I(t_{23}) = \sum_{i=1}^n A_i \exp\left(-\frac{t_{23}}{\tau_i}\right) + A_{n+1} \exp\left(-\frac{t_{23}^2}{\sigma^2}\right).$$

Gleichung 6.3

Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Abbildung 6.11: 3-PEPS-Kurve von DiDC₁ in Wasser bei 26°C mit einer Anpassung aus der Summe dreier Exponentialfunktionen und einer Gaußfunktion mit den Zeitkonstanten 17 fs, 1 ps, 7.5 ps und 180 ps. Unterhalb den 3-PEPS-Kurven sind jeweils die Residuen, d.h. die Differenz aus Messdaten und Anpassung, abgebildet.

i	A_i	τ_i	σ	$A_i/\Sigma A_i$
1	2.5 fs	180 ps	-	16.7 %
2	0.7 fs	7.5 ps	-	4.7 %
3	2.8 fs	1 ps	-	18.7 %
4	9 fs	-	17 fs	60.0 %

Tabelle 6.1: Zusammenstellung der ermittelten Parameter gemäß Gleichung 6.3 für DiDC₁ in Wasser bei 26°C.

Abbildung 6.11 zeigt außerdem die Residuen, die sich aus der Differenz der Messdaten und der Anpassungsfunktion ergeben. Sie repräsentieren im Wesentlichen die oszillatorischen Anteile der 3-PEPS-Signale. Im Folgenden wird versucht, die einzelnen Zeitkonstanten in einen Zusammenhang mit der Solvatationsdynamik des Wassers zu bringen.

In früherer Arbeit von Vöhringer und Mitarbeitern konnte das Abklingen der 3-PEPS nur bis zu einer maximalen Verzögerung t_{23} von 50 ps gemessen werden [141]. Die vorliegenden Messungen mit einem auf 300 ps ausgedehnten Messbereich liefern eine langsamste Komponente mit einer Relaxationszeit $\tau_1 = 180 \text{ ps}$ und zeigen damit, dass die als Inhomogenität bezeichneten Beiträge immer noch auf langen Zeitskalen abklingen. Die ermittelte Zeitkonstante hat allerdings nur eine Genauigkeit von $\pm 100 \text{ ps}$. Der Grund für diese Ungenauigkeit liegt bei dem noch immer für diese Zeitkonstante zu kurzem Messbereich. Bei Messungen in der Boxcar-Geometrie kommt erschwerend hinzu, dass der Peakshift nur relativ zur Autokorrelation bestimmt wird (siehe Kapitel 5.3). Aufgrund dieser Art der Peakshiftbestimmung kann es durch Gruppenlaufzeitunterschiede der Pulse zu einer Fehlbestimmung des Zeitnullpunktes kommen. Dieser Fehler wirkt sich auf die Genauigkeit der Zeitkonstanten der langsamsten Komponente des 3-PEPS negativ aus. Es bleibt allerdings festzuhalten, dass der Peakshift nach 300 ps noch nicht abgeklungen ist. Der endliche Peakshift bei den größten Verzögerungen t_{23} reflektiert das Einsetzen langsamer spektraler Diffusionsvorgänge in der Flüssigkeit. Dies belegen insbesondere die weiter unten abgebildeten temperaturabhängigen 3-PEPS-Kurven (Abbildung 6.15), welche in der Dreiecksgeometrie gemessen wurden und daher den absoluten Peakshift wiedergeben.

Das langsame Abklingen des 3-PEPS mit einer Zeitkonstanten $\tau_1 = 180$ ist vermutlich auf die kollektive Rotationsdiffusion des Lösungsmittels zurückzuführen. Auf ähnlichen Zeitskalen findet allerdings auch die Rotationsdiffusion des Farbstoffs statt [142, 143]. Eine genaue Zuordnung ist auf Grund der oben erwähnten Ungenauigkeiten und der unvollständigen Informationen bezüglich dieser kollektiven Rotationsmoden des Wassers zur Zeit nicht möglich.

Das exponentielle Abklingen der 3-PEPS-Funktion im Bereich zwischen 3 und 50 ps wird mit einer Zeitkonstante von $\tau_2 = 7.5 \text{ ps}$ beschrieben. Aufgrund der geringen

Amplitude (siehe Tabelle 6.1) besitzt die Zeitkonstante dieser Komponente nur eine Genauigkeit von 1 ps. Trotz der schwierigen Bestimmung dieser Zeitkonstanten, konnte sie in wiederholten Messungen mit der angegebenen Genauigkeit reproduziert werden.

Diese Abklingzeit ist in guter Übereinstimmung mit der Reorientierungskorrelationszeit einzelner Wassermoleküle, wie sie aus Messungen der dielektrischen Relaxation (DR) [144] und longitudinalen NMR-Relaxationszeiten [145-147] sowie aus zeitaufgelösten THz-Experimenten [148, 149] bestimmt wurde. Neueste Messungen des Raman-induzierten optischen Kerr-Effekts (OKE) [150] an Wasser zeigten, dass die Zeitkonstante der Rotationsdiffusion, die aus NMR-Experimenten [151] über die Spin-Gitter-Relaxation R_1 erhalten wird, und die langsamste Zeitkonstante aus diesen OKE-Experimenten die gleiche Moleküldynamik beschreiben [150].

Die Relaxation im Bereich von 50 fs bis 3 ps kann mit einer Zeitkonstanten von $\tau_3 = 1 \text{ ps}$ angepasst werden. Sie lässt sich mit einer Genauigkeit von $\pm 0.1 \text{ ps}$ bestimmen. Lediglich die Oszillationen, die weiter unten diskutiert werden, erschweren eine Ermittlung dieser Zeitkonstanten.

Ein Vergleich mit den bereits erwähnten OKE-Daten [150] und Daten aus depolarisierten Ramanexperimenten [152] zeigt, dass diese Komponente mit der Relaxation einer übergedämpften, kollektiven Translationsmode des reinen Wasser übereinstimmt. Des Weiteren ist dieses Zeitfenster von kritisch gedämpften, gehinderten Translationsmoden des reinen Lösungsmittels bestimmt. Diese Moden beschreiben die Streckung und Biegung von Wasserstoffbrückenbindungen in Wasserclustern unterschiedlicher Größe. Nach Arbeiten von Walrafen und Mitarbeitern [153] können diese Bewegungen mit den transversalen akustischen (TA) und longitudinalen akustischen (LA) Phononen von amorphem und kristallinem Eis in Verbindung gebracht werden (TA-Bande bei $60 - 70 \text{ cm}^{-1}$, LA-Bande bei $164 - 181 \text{ cm}^{-1}$).

Schließlich soll das Abklingen der 3-PEPS-Funktion im Bereich unter 50 fs, das durch eine Gaußfunktion mit der Zeitkonstanten von $\sigma_4 = 17 \text{ fs}$ angepasst werden kann, diskutiert werden. Da das Abklingen der 3-PEPS-Funktion um $t_{23} = 0$ auf die Form der System-Bad-Korrelationsfunktion unempfindlich ist, könnte der

Anfangsbereich ebenso mit einer Exponentialfunktion angepasst werden [136, 154, 155]. Eine Gauß-Funktion entspricht jedoch dem theoretisch erwarteten Verlauf der Solvatationskorrelationsfunktion [76].

Ursache dieser ultraschnellen Dynamik könnten nach Jimenez und Mitarbeitern [156] die Librationsmoden der Wassermoleküle in der ersten Hydratationsschale des Chromophors sein. Gegen diese Interpretation spricht jedoch die Tatsache, dass die schnellsten intermolekularen Moden des Wassers eine Schwingungsperiode von ungefähr 67 fs aufweisen. In Infrarot- und Ramanspektren werden diese Moden um 500 cm^{-1} sichtbar.

Bei 3-PEPS-Experimenten wird die Zuordnung dieser ultrakurzen Zeitkonstanten erschwert, da die 3-PEPS-Funktion $S(t_{23})$ nur für den langsamen Teil von $M(t_{23})$ in einer direkten Beziehung zur Solvation steht (Kapitel 4). Der ultraschnelle Anteil von $S(t_{23})$ mit einer Zeitkonstanten, die kürzer als die Pulshalbwertsbreite ist, kann nicht mehr zum langsamen Teil $M_{\text{slow}}(t_{23})$ gezählt werden. Die 3-PEPS-Funktion $S(t_{23})$ überschätzt vielmehr die Amplitude des schnellen Anteils der Solvatationsfunktion $M'_{\text{fast}}(t_{23})$ und unterschätzt seine Zeitkonstante. Eine Solvatationskorrelationsfunktion, die aus einer theoretisch hergeleiteten spektralen Dichte berechnet wurde, zeigt dementsprechend eine relative Amplitude von 58 % und eine Zeitkonstante von 28 fs [154]. Der Grund dieser ultrakurzen Komponente der Solvation bleibt trotz vielseitiger Interpretationsversuche unklar. Mehrere Arbeitsgruppen haben versucht, mit Hilfe molekulardynamischer Simulationen [157, 158] und dielektrischen Kontinuumstheorien [159] ihren Ursprung zu erörtern. Die so erhaltenen Zeitkonstanten liegen allerdings bei weniger als 25 fs mit einer Amplitude von 70-90%. Diese Parameter sind nicht mit den von Huppert und Mitarbeitern [160] sowie Lang und Mitarbeitern [154] ermittelten Werten konsistent. Aus diesen Gründen wird im Folgenden von einer weiteren Betrachtung der ultrakurzen Komponente Abstand genommen.

Neben dem exponentiellen Abklingverhalten fallen im Bereich von 0 bis 10 ps Oszillationen der 3-PEPS-Kurve auf (Abbildung 6.11). Diese Schwingungen resultieren aus intramolekularer Wellenpaketdynamik des Farbstoffes [75]. Nach Subtraktion der Gauß- und Exponentialfunktionen wird deshalb an den Residuen $(S(t_{23}) - I(t_{23}))$ eine Fourieranalyse durchgeführt.

Das so gewonnene Amplitudenpektrum der 3-PEPS-Daten im Vergleich zum TG-Spektrum aus Abschnitt 6.1 ist in Abbildung 6.12 aufgetragen. Zwischen den beiden

Spektren besteht eine sehr gute Übereinstimmung. Lediglich die Amplituden der Banden sind verschieden. Auch die im Spektrum des transienten Gitters deutlich sichtbare Bande bei etwa 800 cm^{-1} ist im 3-PEPS-Spektrum erkennbar. Eine Diskussion der Schingungsstruktur des Chromophors kann Kapitel 6.1 d.) entnommen werden.

Abbildung 6.12: Fourierspektrum von DiDC₁ in Wasser bei 26°C ; Die Amplituden B_i zu Schwingungen mit $\omega_i < 80\text{ cm}^{-1}$ sind in beiden Graphen Null gesetzt, um einen besseren Vergleich der Spektren zu ermöglichen:
a.) TG-Messung; b.) 3-PEPS-Messung.

Zur Konsistenzprüfung wurden die experimentellen Daten einer LP-SVD Analyse („linear prediction-singular value decomposition“) unterworfen. Der Simulationsalgorithmus zerlegt die Daten in eine Überlagerung exponentiell gedämpfter Schwingungen gemäß [161, 162]:

$$F(t) = \sum_i B_i \cos(\omega_i \cdot t + \phi_i) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right),$$

Gleichung 6.4

wobei B_i die Amplitude, ω_i die Frequenzen, ϕ_i die relativen Phasen und τ_i die Dämpfungskonstanten der individuellen Komponenten darstellen.

Die Summe aus oszillatorischen (Gleichung 6.4) und nicht-oszillatorischen (Gleichung 6.3) Komponenten, die aus der Analyse gewonnen wurden, ist zusammen mit den experimentellen Daten in Abbildung 6.13 dargestellt. Die Residuen unterhalb der Graphen stellen die Qualität der Anpassung heraus. Das Rauschen ΔPS beträgt weniger als ± 0.4 fs, wenn von einer geringen Modulation im Ultrakurzzeitbereich bei $t_{23} = 10$ fs abgesehen wird. Dieses Rauschen entspricht der Messgenauigkeit der vorgestellten Peakshift-Messung.

Abbildung 6.13: 3-PEPS-Messkurven von DiDC₁ in reinem Wasser bei 26°C inklusive einer Anpassung aus oszillatorischen und nicht-oszillatorischen Anteilen. Im unteren Teil sind die jeweiligen Residuen abgebildet.

Die spezifischen Oszillationen des Farbstoffes wurden bei der Diskussion der Messungen des transienten Gitters erörtert und sowohl die langsamste als auch die ultraschnelle Zeitkonstante bedürfen genauerer Untersuchungen. Für einen Vergleich mit anderen Arbeiten verbleiben noch die Relaxationszeiten von $\tau_3 = 1$ ps und $\tau_2 = 7.5$ ps.

Erste Messungen zur Bestimmung der ultraschnellen Solvationsdynamik in Wasser wurden von Barbara und Mitarbeitern [163] durchgeführt. In diesen Arbeiten wurden zeitaufgelöste Messungen zur Bestimmung der dynamischen Stokes-Verschiebung eines Coumarin-Farbstoffes mittels Fluoreszenzkonvertierungsspektroskopie durchgeführt. Die dynamische Stokes-Verschiebung wurde mit zwei Exponentialfunktionen mit Abklingzeiten von 0.16 ps und 1.2 ps angepasst. Ihr amplitudengewichteter Mittelwert entspricht einer Zeitkonstanten von $\tau = 0.86$ ps. Die Gerätefunktion der Messungen entsprach einer Gauß-Funktion mit einer Halbwertsbreite von 280 fs. In jüngeren Messungen von Jimenez und Mitarbeitern [156] konnte die Zeitauflösung mit dieser Technik auf 100 fs verbessert werden. Die von ihnen bestimmte Solvationskorrelationsfunktion klingt triexponentiell mit zwei schnelleren und einer langsameren Zeitkonstanten von $\tau = 0.88$ ps ab.

In einer weiteren Arbeit berechnen Marcus und Mitarbeiter [164] die Solvationskorrelationsfunktion aus lösungsmittelspezifischen, dielektrischen Dispersionsdaten $\varepsilon(\omega)$. Die innerhalb des dielektrischen Kontinuum-Modells berechnete Solvationskorrelationsfunktion gibt den Verlauf der oben erwähnten dynamischen Stokes-Verschiebung gut wieder. In diesem Modell wird das Lösungsmittel als uniformes, dielektrisches Kontinuum verstanden, welches lediglich durch die frequenzabhängige dielektrische Funktion $\varepsilon(\omega)$ charakterisiert ist [166, 167, 184, 186, 191-197]. Für den jeweiligen Chromophor wurde eine sphärische oder ellipsoide Form angenommen. Zur Berechnung einer Solvationskorrelationsfunktion wurde von einer instantanen Präparation des Dipols ausgegangen. Die Berechnungen ergaben eine Zeitkonstante von $\tau = 810$ fs, die sowohl mit der ermittelten Relaxationszeit von $\tau = 0.86$ ps aus Fluoreszenzkonvertierungsexperimenten übereinstimmt, als auch mit der Zeitkonstanten der hier vorgestellten 3-PEPS-Experimente von $\tau_3 = 1$ ps. Die wichtigsten Ergebnisse dieses theoretischen Modells werden im Folgenden näher erläutert [164]:

Zunächst wird das Spektrum der dielektrischen Funktion $\varepsilon(\omega)$ in einen hochfrequenten und einen niederfrequenten Bereich unterteilt. Der niederfrequente Anteil kann mit der Debye-Formel im Intervall von $0 \text{ cm}^{-1} \leq \omega \leq 1.6 \text{ cm}^{-1}$ beschrieben werden:

$$\varepsilon''(\omega) = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{\omega \cdot \tau_D}{1 + \omega^2 \cdot \tau_D^2} = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{\Lambda_D \cdot \omega}{\Lambda_D^2 + \omega^2}$$

Gleichung 6.5

Die inverse Debye-Relaxationszeit wird mit $\Lambda_D = \tau_D^{-1}$ bezeichnet. Die Grenzwerte für dielektrischen Funktion sind die statistische Dielektrizitätskonstante ε_s für $\omega = 0$ und ε_∞ für $\omega \rightarrow \infty$. Der Bereich des Spektrums, in dem eine Näherung mit Hilfe der Debye-Formel zulässig ist, beschreibt die Solvatationskorrelationsfunktion für lange Zeiten. Dieser Zeitbereich ist durch Diffusionsprozesse charakterisiert. Der hochfrequente Bereich hat dagegen Einfluss auf die Solvatationsfunktion zu frühen Zeiten. Diese hohen Frequenzen resultieren aus inter- und intramolekularen Moden des Lösungsmittels.

Marcus und Mitarbeiter stellen des Weiteren klar heraus, dass eine Debye-Relaxation experimentell nur auf Zeitskalen länger als 3 ps beobachtet werden kann. Die berechnete Zeitkonstante von $\tau = 810$ fs wird daher zurecht einer Mischung aus Debye-Relaxation und einer Relaxation auf Grund höherfrequenter Moden der Flüssigkeit zugeordnet.

In Übereinstimmung mit den Betrachtungen von Marcus und Mitarbeitern wird die in den 3-PEPS-Experimenten beobachtete Relaxation mit der Zeitkonstanten $\tau_3 = 1$ ps den höherfrequenten Moden des Wassers zugeordnet. Zu diesen Moden gehören die intermolekularen gehinderten Translationsmoden des Wassers.

Die ermittelte Zeitkonstante von $\tau_2 = 7.5$ ps stimmt weiterhin mit der Aussage von Marcus und Mitarbeitern darin überein, dass eine Debye-typische Relaxation auf längeren Zeitskalen als 3 ps zu erwarten ist. Die Zuordnung dieser Zeitkonstante zur diffusiven Reorientierungskorrelationszeit von individuellen Wassermolekülen ist aus diesem Grund mit den theoretischen Ergebnissen zur Debye-Relaxation von Marcus und Mitarbeitern konsistent. Die Übereinstimmung beider Zeitkonstanten mit den Ergebnissen aus Messungen des optisch Kerr-Effektes [150] unterstützen diese Zuordnung.

Von Fleming und Mitarbeitern [154] wurden ebenfalls 3-PEPS-Messungen veröffentlicht, die die Solvatation von Eosin Y, einem Fluorescein-Derivat, in Wasser beschreiben. In deren Arbeit wurde die Solvatationskorrelationsfunktion ebenfalls mit drei Exponentialfunktionen mit den Zeitkonstanten 17 fs, 400 fs, und 2.7 ps beschrieben. Diese Anpassung wird in Abbildung 6.14 mit den obigen 3-PEPS-Daten dieser Arbeit verglichen. Wie deutlich zu sehen ist, liegt bis zu einer Zeit von 1 ps eine grobe Übereinstimmung vor. Die schnellste Komponente von Fleming und Mitarbeitern ($\tau = 17$ fs) taucht auch in der hier vorgestellten Messung auf. Im Bereich oberhalb von 2 ps divergieren die beiden Datensätze. Die 3-PEPS-Messung von Fleming und Mitarbeitern ist nach 15 ps bereits vollständig auf Null abgefallen, während die in dieser Arbeit vorgestellten Daten selbst nach einigen 100 ps noch nicht abgeklungen ist. Offensichtlich trägt die Komponente der Rotationsdiffusion ($\tau_2 = 7.5$ ps) nicht zur Solvatationsdynamik von Eosin Y in Wasser bei.

Abbildung 6.14: Auftragung der 3-PEPS-Daten von DiDC_1 in reinem Wasser sowie der Anpassung der Solvatationsdynamik der Eosin Y Messung in Wasser nach Experimenten von Fleming und Mitarbeitern [154].

Fleming und Mitarbeiter versuchten eine quantitative Analyse ihrer Daten vorzunehmen, indem zunächst auf Basis quantenchemischer Rechnungen die Ladungsdichtenverteilungen des Chromophors im Grund- und angeregten Zustand ermittelt wurden. Des Weiteren wurden aus TG-Messungen die Schwingungsfrequenzen des Chromophors abgeschätzt. Ähnlich wie bei Marcus und Mitarbeitern wurde anschließend die Solvatationskorrelationsfunktion mit Hilfe einer dielektrischen Kontinuumstheorie berechnet. Die hierzu notwendige spektrale Dichte der Flüssigkeit wurde aus THz-IR-Daten ermittelt. Die simulierte 3-PEPS-Funktion konnte jedoch ohne zusätzliche Korrekturen die Messdaten innerhalb der Messgenauigkeit nicht wiedergeben. Um eine bessere Übereinstimmung zu erlangen, war es nötig, einen zusätzlichen übergedämpften Brownschen Oszillator mit einer Korrelationszeit von $\tau = 8$ ps zur spektralen Dichte künstlich hinzuzufügen. Die spektrale Dichte eines solchen übergedämpften Brownschen Oszillators wird durch

$$C(\omega) = \frac{2 \cdot \lambda}{\pi} \cdot \frac{\Lambda \cdot \omega}{\Lambda^2 + \omega^2}$$

Gleichung 6.6

beschrieben. Die Solvatationskorrelationsfunktion $M(t)$ dieses Brownschen Oszillators klingt exponentiell mit Λ ab (siehe Kapitel 4.4).

Im Debye-Bereich sind daher die von Fleming und Mitarbeitern hinzugefügte spektrale Dichte (Gleichung 6.6) und die dielektrische Antwort des Wassers identisch (Gleichung 6.5), da beide eine Zeitkonstante von etwa 8 ps besitzen. Diese Komponente beschreibt die Rotationsdiffusion individueller Moleküle in reinem Wasser. Es bleibt weiterhin unklar, wie dieses Modell, das einen übergedämpften Brownschen Oszillator mit einer Zeitkonstanten von $\tau = 8$ ps beinhaltet, die experimentellen 3-PEPS-Daten von Eosin Y wiedergeben kann, während sich dieselben experimentellen Daten adäquat durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschreiben lassen, deren langsamste Zeitkonstante nur 2.7 ps beträgt.

Die Diskrepanz der Daten von Lang und Mitarbeitern zu den hier vorgestellten 3-PEPS-Resultaten beruht möglicherweise auf der Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe. Während die gemessene Solvatationsdynamik mit DiDC₁ als Sensor-Farbstoff die Rotationsdiffusion individueller Moleküle beinhaltet, scheint das doppelt

geladene Eosin Y zur Studie von reinem Wasser keine gute Wahl zu sein. Eosin Y stört vielmehr durch die ladungsbedingten Wechselwirkungen mit dem umgebenden Wasser die wassereigene Dynamik. Untersuchungen zur Rotationsdiffusion von Eosin Y deuten an, dass in wässriger Lösung Wasserstoffbrücken zwischen Lösungsmittel und Farbstoff ausgebildet werden, die diffusive Bewegungen deutlich behindert [171]. Derartige Effekte sind bei DiDC₁ nicht beobachtet worden.

6.3.2 Temperaturabhängigkeit der Solvation von DiDC₁ in Wasser

Temperaturabhängige 3-PEPS-Messungen in der Boxchargeometrie wurden durchgeführt, um die Zuordnung der obigen Zeitkonstanten durch ihr Temperaturabhängigkeit zu verifizieren. In Abbildung 6.15 ist die 3-PEPS-Funktion gegen die Verzögerungszeit t_{23} für verschiedene Temperaturen (10°C, 25°C, 50°C, 75°C) aufgetragen.

Abbildung 6.15: 3-PEPS-Funktion von DiDC₁ in Wasser bei den Temperaturen 10°C, 25°C, 50°C und 75°C. Aufgetragen ist der Peakshift gegen die Zeit t_{23} . In der Einblendung ist die gesamte Messkurve abgebildet, während im Hauptgraphen der Bereich vergrößert gezeigt ist, in dem Temperatureffekte sichtbar werden.

Um das exponentielle Abklingverhalten richtig zu erfassen, wurden die Kurven in der Dreiecksgeometrie mit einem exponentiell anwachsenden Punktabstand gemessen. Es ist deutlich sichtbar, dass die Signale bei höheren Temperaturen schneller abklingen. Des Weiteren ist eine Inhomogenität bis hin zu 300 ps in der Einblendung zu beobachten.

Wie in Kapitel 6.3.1 beschrieben, wurden die gemessenen Daten mittels einer Gauß- und dreier Exponentialfunktionen gemäß Gleichung 6.3 angepasst. Demnach ergeben sich die in Tabelle 6.2 zusammengetragenen Anpassungsparameter.

Temperatur	i	A_i	τ_i	σ	$A_i/\Sigma A_i$
10°C	1	1.59 fs	700 ps	-	10.2 %
	2	0.38 fs	10 ps	-	2.4 %
	3	2.65 fs	1.6 ps	-	17.0 %
	4	11 fs	-	-	70.4 %
25°C	1	1.46 fs	750 ps	-	9.1 %
	2	0.35 fs	8 ps	-	2.2 %
	3	2.8 fs	1.1 ps	-	17.4 %
	4	11.5 fs	-	11 fs	71.4 %
50°C	1	1.18 fs	700 ps	-	7.7 %
	2	0.4 fs	7 ps	-	2.6 %
	3	2.2 fs	0.8 ps	-	14.4 %
	4	11.5 fs	-	11 fs	75.3 %
75°C	1	1 fs	700 ps	-	6.7 %
	2	0.35 fs	3.5 ps	-	2.4 %
	3	2 fs	0.45 ps	-	13.5 %
	4	11.5 fs	-	11 fs	77.4 %

Tabelle 6.2: Parameter der Anpassung der temperaturabhängigen Peakshiftkurven von DiDC₁ in Wasser mit den Gauß- und Exponentialfunktionen gemäß Gleichung 6.3.

Die Oszillationen des Farbstoffes lassen sich bei diesen Messkurven schlechter anpassen als bei den bereits vorgestellten 3-PEPS-Messungen in Wasser, da hier mit exponentiell wachsender Verzögerung gemessen wurde. Die Zeitkonstanten für 25°C stimmen gut mit denen aus der Boxchargeometrie (Tabelle 6.1) überein.

Lediglich die Zeitkonstante für den quasi-statischen Teil der 3-PEPS-Kurve weicht deutlich ab. Dieser Unterschied auf längsten Zeitskalen resultiert, wie bereits erwähnt, aus einer unzureichenden Verzögerungszeit von t_{23} und der Unschärfe des Zeitnullpunktes in der Boxchargeometrie. Auf diese langsame Abklingzeit wird daher nicht weiter eingegangen. Wie oben erläutert, werden im Folgenden lediglich die Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 der 3-PEPS-Funktion diskutiert.

Diese beiden temperaturabhängigen Zeitkonstanten werden nun mit denen aus Messungen der dielektrischen Relaxation (DR), der magnetischen Kern-Spin-Resonanz (NMR), der zeitaufgelösten THz-Spektroskopie, des depolarisierten Ramanspektrums und des optischen Kerr-Effekts (OKE) verglichen.

Das Abklingverhalten der 3-PEPS-Kurve zwischen 3 bis 50 ps ist dominiert durch die Zeitkonstante $\tau_2 = 7.5$ ps bei 26°C und wurde bereits im vorherigen Abschnitt der Reorientierungskorrelationszeit individueller Wassermoleküle zugeordnet. Zum Vergleich dieser Zeitkonstanten mit denen aus anderen Messmethoden ermittelten Werten, ist es wichtig ihren Zusammenhang zu verwandten, experimentell zugänglichen Observablen zu kennen. In Photon-Echo-Experimenten, der dielektrischen Relaxation sowie der zeitaufgelösten THz-Spektroskopie wird die Zeitkonstante aus der Dipolkorrelationsfunktion bestimmt:

$$\tau^{(1)} = \int_0^{\infty} \left\langle P_1 \left[\sum_j \mu_i(0) \cdot \mu_j(t) \right] \right\rangle dt ,$$

Gleichung 6.7

wobei μ_i das Dipolmoment des Moleküls i zum Zeitpunkt t ist und P_1 das erste Legendre-Polynom bezeichnet.

Demgegenüber liefern kernresonanz-spektroskopische Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit die Orientierungskorrelationsfunktion:

$$\tau^{(2)} = \int_0^{\infty} \langle P_2 [u_i(0) \cdot u_i(t)] \rangle dt .$$

Gleichung 6.8

Dabei beschreibt $u_i(t)$ einen Einheitsvektor im Molekül i zur Zeit t und P_2 das zweite Legendre-Polynom.

Ein Vergleich der Relaxationszeiten aus Gleichung 6.7 ($\tau^{(1)}$) und Gleichung 6.8 ($\tau^{(2)}$) ist nur möglich, wenn bei der Dipolkorrelationsfunktion (Gleichung 6.7) die kollektiven Dynamiken verschwinden, d.h. alle Terme mit $i \neq j$ gleich Null sind. Lynden-Bell und Steele [172-174] zeigten, dass dann folgender Zusammenhang zwischen $\tau^{(1)}$, $\tau^{(2)}$ und der Debye-Relaxation τ_D gilt:

$$\tau^{(2)} = \frac{\tau^{(1)}}{3} = \frac{\tau_D}{3}.$$

Gleichung 6.9

Vöhringer und Mitarbeitern [150] konnten zeigen, dass dieser Zusammenhang zwischen $\tau^{(1)}$ und $\tau^{(2)}$ über den gesamten thermodynamisch Stabilitätsbereich der Flüssigkeit bei 1 bar Gültigkeit besitzt. Darüber hinaus konnte auch die langsame Komponente der OKE-Signale eindeutig der Rotationsdiffusion individueller Moleküle zugeordnet werden. Die Autoren haben sämtliche temperaturabhängige Zeitkonstanten, die mit verschiedensten Techniken gewonnen wurden, zusammengetragen. Die Ergebnisse dieser Arbeit [150] sind in Abbildung 6.16 wiedergegeben. Zum Vergleich sind die temperaturabhängigen Zeitkonstanten der hier vorgestellten 3-PEPS-Experimente eingefügt. Die gute Übereinstimmung aller Daten bestätigt die ursprüngliche Zuordnung der 3-PEPS-Relaxationszeit τ_2 zur diffusiven Reorientierung individueller Moleküle.

Die temperaturabhängige Zeitkonstante τ_3 der 3-PEPS-Experimente, die im Bereich um 1 ps liegt, wurde übergedämpften, gehinderten kollektiven Translationsmoden sowie höherfrequenten Lösungsmittelmoden zugeordnet. In früheren Arbeiten wurde diese Zeitkonstante der mittleren Lebensdauer von Wasserstoffbrückenbindungen zugeschrieben. Aus einer Arrhenius-Auftragung kann in diesem Fall die Aktivierungsenergie und die Bindungsstärke bestimmt werden [175, 176]. Vöhringer und Mitarbeiter [150] konnten jedoch zeigen, dass diese Interpretation aus verschiedenen Gründen nicht zutreffend ist und die Relaxationszeit vielmehr gehinderte, kollektive Translationsmoden des Wassers repräsentiert. Das Verhältnis der Zeitkonstanten von D_2O zu H_2O zeigt einen sehr geringen Isotopeneffekt und unterstützt die Interpretation einer kollektiven Translation [177]. Das temperatur-

abhängige Verhalten der 3-PEPS-Signale bestätigt somit die bereits erfolgte Zuordnung der Zeitkonstanten.

Abbildung 6.16: Zeitkonstanten der temperaturabhängigen Messungen von DiDC₁ in Wasser im Vergleich mit Zeitkonstanten aus der DR, NMR, OKE, THz und depolarisierten Ramanspektroskopie; Die Zeiten aus OKE- und NMR-Experimenten in Auftragung a.) wurden mit 3 multipliziert.

a.) Zeitkonstanten τ_2 der 3-PEPS-Messungen mit Fehlerbalken

b.) Zeitkonstanten τ_3 der 3-PEPS-Messungen mit Fehlerbalken

6.4 Drei-Puls-Echo-Peakshift-Messungen von DiDC₁₈ an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht.

Die Solvatationsdynamik der Wassermoleküle an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht ist aus verschiedenen Gründen, auf die weiter unten eingegangen wird, nur unzureichend beschrieben. Um diese Dynamik zu bestimmen, wurde mit DiDC₁₈ ein Farbstoff gewählt, der durch die langen aliphatischen Ketten und zwitterionischen Chromophor in den amphiphilen Eigenschaften den Lipiden ähnelt. Der Chromophor befindet sich daher direkt an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht (Abbildung 6.1). Aus diesem Grund ist eine Solvatationsdynamik zu erwarten, die vom Wasser an der Grenzschicht und den Kopfgruppen der Lipide geprägt ist. Die Kopfgruppen lassen entsprechend ihrer Größe eine langsame Dynamik erwarten, während die Dynamik des reinen Wassers Zeitkonstanten im Bereich von wenigen Femto- bis hin zu einigen Pikosekunden aufweisen sollte. In diesem Zeitfenster sind die vorgestellten 3-PEPS-Messungen besonders empfindlich.

In Kapitel 6.4.1 wird die Solvatationsfunktion bei 26°C in DMPC analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse werden in Kapitel 6.4.2 in Bezug auf Ergebnisse aus der Literatur diskutiert. Kapitel 6.4.3 konzentriert sich auf die Temperaturabhängigkeit dieser Funktion und hebt das Phasenverhalten der Vesikel und der damit verbundenen Solvatationsdynamik heraus.

6.4.1 Analyse der Solvatationsdynamiken an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht im Vergleich zum Wasser

Die 3-PEPS-Kurve von DiDC₁₈ an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht ist in Abbildung 6.17 dargestellt. Auf kurzen Zeitskalen ($t_{23} < 50$ fs) klingt sie ähnlich wie in der wässrigen Volumenphase gaußförmig ab. Im Gegensatz zur Solvatationsdynamik des gleichen Chromophors in Wasser benötigt man nur zwei Exponentialfunktionen, um das Abklingen des 3-PEPS zu reproduzieren.

Die Zeitkonstante τ_1 der langsamsten Komponente ist wie bei den Messungen im Wassers unzureichend bestimmbar.

Abbildung 6.17: 3-PEPS-Kurven und Residuen von DiDC₁₈ in DMPC/Wasser aufgetragen gegen die Verzögerungszeit t_{23} inklusive der Residuen:

- a.) Anpassungsfunktion bestehend aus drei Exponentialfunktionen;
b.) Anpassungsfunktion bestehend aus drei Exponentialfunktionen und gedämpften Schwingungen.

i	A_i	τ_i	$A_i/\Sigma A_i$
1	3.98 fs	155 ps	35.4 %
2	1.25 fs	7.5 ps	11.1 %
3	-	-	-
4	6 fs	30 fs	53.4 %

Tabelle 6.3: Zusammenstellung der ermittelten Parameter gemäß Gleichung 6.3;
DiDC₁₈ in DMPC/H₂O

Erste Messungen an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht in der Dreiecksgeometrie (nicht abgebildet) zeigen jedoch, dass der Peakshift bei 300 ps noch nicht auf Null abgefallen ist. Diese „Inhomogenität“ besitzt nahezu die doppelte Amplitude,

wie die diskutierte „Inhomogenität“ in der Wasservolumenphase. Bei den Grenzschichtmessungen reflektieren diese statischen Beiträge die großen Zeitskalen der Rotations- und Translationsdiffusion des Chromophors und entsprechen daher echten spektralen Diffusionsprozessen. Messungen der Stokes-Verschiebung geeigneter Chromophore in Zeitbereichen von mehreren Nanosekunden sollten in der Lage sein, diese langsame Dynamik näher zu charakterisieren.

Die Komponente mit der Zeitkonstanten τ_2 dominiert nahezu das gesamte Abklingen der experimentellen Peakshift-Daten. Sie ist mit $\tau_2 = 7.5 \text{ ps}$ identisch zur bereits in Wasser beobachteten Rotationsdiffusion individueller Moleküle. Da der verwendete Chromophor derselbe wie bei den Messungen in reinem Wasser ist und sich außerdem in der polaren Grenzschicht mit hohem Wasseranteil befindet, ist es naheliegend, diese Relaxation Dynamiken einzelner Wassermoleküle zuzuschreiben. Die Relaxation angrenzender Kopfgruppen sollte dagegen auf längeren Zeitskalen stattfinden und trägt dementsprechend zur quasi-statischen Inhomogenität bei. Eine Komponente mit einer Abklingzeit von **1 ps** wird im Gegensatz zu Wasser an der Grenzschicht nicht beobachtet. Das Fehlen dieser Zeitkonstanten, die den kollektiven gehinderten Translationsmoden des reinen Wassers zugeordnet wird, deutet auf eine Änderung der wasserspezifischen Struktur hin. Die kollektiven Translationsmoden stehen im direkten Zusammenhang zur Struktur des Wasserstoffbrückennetzwerkes. Eine vollständige Unterdrückung dieser Mode deutet auf ein stark gestörtes Wasserstoffbrückennetzwerk hin. Ganz offensichtlich ist das Wasserstoffbrückennetzwerk an der Lipidgrenzschicht stark durch die polaren Kopfgruppen gestört.

Eine Frequenzanalyse entsprechend Kapitel 6.3.1 ergibt die in Abbildung 6.17 b.) gezeigte Anpassung an die 3-PEPS-Daten. Das Rauschen ist, wie die Residuen in Abbildung 6.17 b.) zeigen, im Bereich von $\Delta\text{PS} = \pm 0.5 \text{ fs}$.

Das Fourierspektrum ist in Abbildung 6.18 b.) dargestellt, während in Abbildung 6.18 a.) ein korrespondierendes TG-Spektrum abgebildet ist. Niederfrequente Anteile unterhalb 80 cm^{-1} sind wiederum subtrahiert. Beide Spektren stimmen sehr gut überein. Die Zuordnung der Schwingungsstruktur wurde bereits in Kapitel 6.1 d.) diskutiert. Abweichungen der Amplituden resultieren vermutlich aus unterschiedlichen Pulsdauern.

Abbildung 6.18: Fourierspektrum von DiDC₁₈ in DMPC/Wasser bei 26°C ; Schwingungen unterhalb 80 cm⁻¹ sind in beiden Graphen herausgefiltert, um einen besseren Vergleich der Spektren zu ermöglichen: a.) TG-Messung; b.) 3-PEPS-Messung.

6.4.2 Diskussion der gemessenen Solvationsdynamik in Bezug zu Arbeiten aus der Literatur

Untersuchungen zur Solvationsdynamik an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht existieren zur Zeit nicht. Es sind dagegen Arbeiten zur Solvationsdynamik in inneren Wassereinschlüssen von Lipidvesikeln und inversen Mizellen vorhanden [4, 5, 7, 10]. Zum einen reichte die Zeitauflösung der durchgeführten Experimente oftmals nicht aus, um die ultraschnelle Solvationsdynamik des Wassers zu bestimmen, zum anderen waren die photochemischen Eigenschaften und die Einbaulagen der verwendeten Farbstoffe nur unzureichend bestimmt.

In der Literatur wurden eine Vielzahl von Farbstoffen zur Klärung der Solvationsdynamik von Wasser in Lipidsystemen herangezogen, wobei im folgenden Abschnitt Untersuchungen präsentiert werden, welche die Farbstoffe Prodan, Laurdan, Patman, DCM, Coumarin 480 und Coumarin 343 als Sensor-Farbstoff verwenden. Die Strukturformeln dieser Fluoreszenzfarbstoffe sind in Abbildung 6.19 dargestellt.

Sie zeichnen sich durch eine starke umgebungsspezifische Stokes-Verschiebung aus, welche aus der Änderung des Dipolmoments bei elektronischer Anregung herrührt.

Abbildung 6.19: Zur Untersuchung der Solvatationsdynamik von Wasser in Lipidsystemen verwendete Sensor-Farbstoffe.

Das von Weber und Mitarbeitern [178] synthetisierte und durch seine stationären Spektren in unterschiedlichen Lösungsmitteln charakterisierte **Prodan** weist eine Stokes-Verschiebung von 4302 cm^{-1} in Cyclohexan bis hin zu 8640 cm^{-1} in Wasser auf. Die Abhängigkeit der Stokes-Verschiebung vom Lösungsmittel wird auf dessen Orientierungspolarisation zurückgeführt. Ein protisches Lösungsmittel bewirkt bei gleicher Orientierungspolarisation eine größere Stokes-Verschiebung. Diese

umgebungsspezifische Stokes-Verschiebung veranlasste Untersuchungen in biologischen Umgebungen mit Hilfe des Sensor-Farbstoffes Prodan. Erste Messungen in DMPC-Vesikeln wurden von Chong und Mitarbeitern [179, 180] durchgeführt. Diese stationären Fluoreszenzmessungen deuten darauf hin, dass sich der Farbstoff in den Bereich der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht einlagert. Von Sommer und Mitarbeitern [181] wurde die Solvationsdynamik in künstlichen Lipiddoppelschichten bestimmt. Die zeitabhängige Stokes-Verschiebung wurde mit Mehrfrequenzphasen- und Mehrfrequenzmodulationsfluorometrie ermittelt, deren Zeitauflösung einige 100 ps beträgt. Auf Grund der limitierten Zeitauflösung beschränken sich die gemessenen Daten auf die Dynamik von Ketten und die Kopfgruppen der Lipide, während die Solvationsdynamik des Wassers nicht aufgelöst werden konnte.

Die stationären Fluoreszenzspektren von Prodan in Membranen weisen zwei Maxima auf. Dies wirkt sich nachteilig auf die Bestimmung der Solvationsdynamik aus. Ein solches Spektrum rührt vermutlich von zwei unterschiedlichen Einbaulagen in der Lipiddoppelschicht her [179, 180, 182]. Hinzu kommt eine geringe Wasserlöslichkeit von Prodan [178]. Eine von Krasnowska und Mitarbeitern [183] vorgeschlagene Interpretation des strukturierten Emissionspektrums schreibt das niederfrequente Maximum des Fluoreszenzspektrums den im Wasser gelösten Prodan zu. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die ausgeprägte bimodale Fluoreszenz offenbart sich durch Vergleich mit der Farbstoff-Sonde **Laurdan**. Diese besitzt einen zum Prodan identischen Chromophor und unterscheidet sich von letzterem lediglich in einer langen aliphatischen Kette. Auch beim Laurdan wird ein bimodales Fluoreszenzspektrum beobachtet. Dieses wird auf einen zusätzlich, höher energetischen Ladungstransferzustand [12, 13, 209] zurückgeführt. Ein anderer Ansatz führt das bimodale Spektrum darauf zurück, dass die Umgebungssolvation auf Zeitskalen der Fluoreszenzlebensdauer stattfindet [187, 188].

Beim Laurdan deuten die stationären Fluoreszenzspektren aufgrund der größeren Stokes-Verschiebung auf eine im Vergleich zum Prodan weniger polare Umgebung hin. Die von Viard und Mitarbeitern [185] ermittelten Dynamiken mit einer Zeitauflösung von ca. 500 ps werden daher den aliphatischen Ketten und Teilen der Kopfgruppe zugeordnet. Fluoreszenzanregungsspektren von Bagatolli und Mitarbeitern [187] deuten darauf hin, dass Laurdan an der Grenzfläche Alkylkette-Kopfgruppe eingelagert ist.

Bei **Patman** handelt es sich um einen weiteren Farbstoff mit einem im Vergleich zum Prodan fast identischen Chromophor. Im Unterschied zu Prodan besitzt Patman eine lange aliphatische Kette ähnlich des Laurdans und eine Trimethylamonium-methylgruppe (Abbildung 6.19). Diese positiv geladene Gruppe soll eine Ausrichtung des Chromophors in Richtung der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht bewirken [1], während die aliphatische Kette den Chromophor in der Doppelschicht verankert.

Patman weist ebenso wie Prodan und Laurdan ein bimodales Emissionsspektrum auf, dessen Ursache nicht eindeutig bekannt ist. Des Weiteren deuten zeitaufgelöste Stokes-Verschiebungsmessungen [2] auf eine im Vergleich zu Prodan unpolarere Umgebung hin. Eine im Vergleich zu Prodan langsamere Solvatationsdynamik und eine kleinere stationäre Stokes-Verschiebung der Emission unterstützen eine solche Interpretation. Der Chromophor befindet sich demnach tiefer in der Lipiddoppelschicht als Prodan.

Die bisher durchgeführten Messungen mit den Sensor-Farbstoffen Prodan, Laurdan und Patman konnten die Solvatationsdynamik des Wassers nicht bestimmen, da bei einer Zeitauflösung der dynamischen Messungen von > 100 ps vorwiegend die Orientierung der aliphatischen Ketten, die Dynamik der Lipidkopfgruppen und die Dynamik des Farbstoffes selbst gemessen wird. Des Weiteren sind die Prozesse, welche zu den bimodalen Fluoreszenzspektren führen nicht ausreichend verstanden. Ein weiterer Farbstoff, der zur Messung der Solvatationsdynamik in Lipiden eingesetzt wurde, ist **Coumarin 480**. Dieser Farbstoff ist in Wasser unlöslich. In Messungen zur dynamischen Stokes-Verschiebung mit einer Zeitauflösung von 50 ps konnten zwei Zeitkonstanten der Solvation bestimmt werden [3]. Diese Zeitkonstanten wurden der Dynamik in inneren Wassereinschlüssen der Vesikel zugeordnet.

Vergleichbare Messungen mit dem Sensor-Farbstoff **DCM** in Vesikeln bzw. Mizellen [5-8] ergeben ebenfalls, dass sich die Solvation durch Wasser mit zwei Zeitkonstanten beschreiben lässt. Das Solvatationsverhalten des Wassers wird in einen schnellen Anteil mit einer Zeitkonstanten von 0.5 ns bis 1 ns und in einen langsamen Anteil mit einer Zeitkonstanten von 2 ns bis 11 ns gegliedert. Die Messungen wurden mit einer Zeitauflösung von ca. 50 ps durchgeführt. Ein Großteil der Solvatationsdynamik blieb auf Grund dieser Zeitauflösung unbeobachtet.

Von Levinger und Mitarbeitern [10] wurden vergleichbare Experimente in inversen

Mizellen mit **Coumarin 343** mit Hilfe der Fluoreszenzkonvertierungsspektroskopie durchgeführt. Mit dieser Technik wurde eine Zeitauflösung von ca. 160 fs erreicht. Es war daher möglich, die Solvation in inversen Mizellen mit der des reinen Wassers zu vergleichen [11]. Die ermittelten Relaxationszeiten in inversen Mizellen sind bedeutend langsamer als in reinem Wasser. Des Weiteren wird entsprechend den obigen Experimenten mit DCM eine Abklingzeit auf einer Nano-sekundenzeitskala beobachtet. Diese Zeitkonstante scheint ihre Ursache in der durch die Lipidschicht gestörten Umgebung zu haben. Nandi und Mitarbeiter haben diesen Zusammenhang herausgearbeitet und postulieren zwei unterschiedliche Formen des Wassers in der Lipidumgebung. Sie unterscheiden zwischen freiem Wasser, welches der reinen Wasserphase entspricht, und gebundenem Wasser. Dieses gebundene Wasser wird auch als „biologisches Wasser“ bezeichnet und befindet sich im Bereich der Kopfgruppen. Ein möglicher dynamischer Austausch zwischen diesen Wasserspezies wird diskutiert [9, 12, 188].

Es bleibt festzuhalten, dass den vorgestellten Sensor-Farbstoffen DCM und den Coumarinen 343 und 480 keine definierte Einbaulage bezüglich der Grenzschicht zugeordnet werden konnte. Außerdem sind lediglich Fluoreszenzkonvertierungsmessungen in der Lage die Solvationsdynamiken von reinem Wasser mit ausreichender Zeitauflösung zu bestimmen.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten 3-PEPS-Experimente besitzen zum einen die notwendige Zeitauflösung um die Solvationsdynamik in Wasser zu beschreiben, zum anderen ist der Farbstoff definiert in der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht verankert. Die langsamen Zeitkonstanten könnten in den bei den 3-PEPS-Messungen gefundenen quasi-statischen Inhomogenitäten verborgen sein. Die Ursache dieser langsamen Zeitkonstanten bleibt jedoch weiterhin unklar, da für einen Vergleich mit der Solvationsdynamik in reinem Wasser die experimentellen Ergebnisse auf diesen langen Zeitskalen noch nicht vorhanden sind. Es kann somit nicht unterschieden werden, ob das Modell von Nandi und Mitarbeitern von freiem und gebundenem Wasser zutrifft oder vielmehr kollektive Moden des Wassers für diese langsamen Zeiten verantwortlich sind.

In Bezug auf die Kurzzeitdynamik der vorgestellten 3-PEPS-Messungen geben **molekulardynamische Berechnungen** einen weiteren Einblick in die Struktur des Wassers an der Grenzschicht. Aus diesen Berechnungen geht hervor, dass zwei bis drei Hydrathüllen um die Kopfgruppen der Lipide angeordnet sind [64]. Die

Wassermoleküle sind über Wasserstoffbrücken an das Sauerstoffatom der Phosphatgruppen und an den Stickstoff der Lipidkopfgruppe als Klathrate gebunden [64, 65]. Die Dynamik des Wassers an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht zeigt deutliche Veränderungen im Vergleich zum reinen Wasser. Des Weiteren weisen die Dipole des Wassers in Richtung des Membraninneren [66]. In Übereinstimmung mit den 3-PEPS-Messungen dieser Arbeit wird das Wasserstoffbrückennetzwerk von den Lipidkopfgruppen stark beeinflusst, so dass es zu einer Eliminierung der kollektiven Translationsfreiheitsgrade kommt. Eine freie Diffusion der Wassermoleküle findet dennoch statt. Die Reorientierung scheint im gleichen Maße wie im reinen Wasser zur Solvation beizutragen [66]. Diese aus molekulardynamischen Simulationen erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den hier vorgestellten Resultaten aus 3-PEPS-Experimenten.

6.4.3 Temperaturabhängigkeit der Solvationsdynamik an der Lipidmembran-Wasser-Grenzschicht

Die in Kapitel 6.4.1 vorgestellte Messung gibt über das Solvationsverhalten an der Grenzschicht in der flüssig-kristallinen Phase Auskunft. Diese Phase ist von biologischer Relevanz und daher auch am intensivsten untersucht. Die Phasenübergänge und die Veränderungen an der Grenzschicht geben jedoch einen tieferen Einblick in die Wechselwirkungen der Lipide untereinander, die letztendlich zur Ausbildung einer Doppelschicht führen. Alle Funktionen der Membran bauen auf diesen Wechselwirkungen auf. Aus diesem Grund wurde das Solvationsverhalten auch in den biologisch weniger relevanten zackigen und gelförmigen Phasen bestimmt.

Bei der Beschreibung der 3-PEPS-Kurven wird bei den folgenden Messungen auf eine erneute Betrachtung der oszillatorischen Bestandteile verzichtet, da diese bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert wurden. Ebenso findet der ultraschnelle Abfall der 3-PEPS-Kurve keine weitere Beachtung, da die 3-PEPS-Experimente in diesem Zeitbereich nicht im direkten Zusammenhang zur Solvationskorrelationsfunktion stehen.

6.4.3.1 Temperaturabhängigkeit der Solvatationsdynamik an der DMPC-Wasser-Grenzschicht

Abbildung 6.20 zeigt eine temperaturabhängige Wärmekapazitätsmessung von DMPC-Vesikeln. Die Pfeile kennzeichnen Temperaturen, bei denen 3-PEPS-Messungen durchgeführt wurden. Die Messung in der gelförmigen Phase $L_{\beta'}$ wurde bei 6°C durchgeführt und die Messung in der zackigen Phase $P_{\beta'}$ in der Nähe des Vorphasenübergangs bei 11°C. Weiterhin wurde in der flüssig-kristallinen Phase L_{α} bei 26°C und 30°C gemessen. Es existieren also Messungen in allen drei thermodynamischen Phasen von DMPC-Vesikeln, die oberhalb der Schmelztemperatur von Wasser bekannt sind.

Abbildung 6.20: Temperaturabhängige Wärmekapazität von DMPC-Vesikeln; mit Pfeilen sind die Temperaturen der durchgeführten 3-PEPS-Experimenten gekennzeichnet.

Die 3-PEPS-Messungen bei diesen Temperaturen sind in Abbildung 6.21 dargestellt. Jede Messkurve wurde mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen angepasst ($i = 1-2$; gestrichelte Kurve), bei 6°C ist zusätzlich eine Summe dreier exponentieller Komponenten notwendig ($i = 1-3$; breite durchgezogene Linie). Die Abklingzeiten und die jeweiligen Amplituden der Exponentialfunktionen sind Tabelle 6.4 zu entnehmen.

Abbildung 6.21: 3-PEPS-Kurven von DiDC₁₈ in DMPC/Wasser bei den Temperaturen 6°C, 11°C, 26°C und 30°C. Zur besseren Veranschaulichung sind die jeweiligen Messungen relativ zueinander verschoben. Die gestrichelten Kurven geben eine Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen wieder, die durchgezogene Linie entspricht einer Anpassung bei 6°C, die drei Exponentialfunktionen beinhaltet.

Temperatur	Lipidphase	i	A_i	τ_i
6°C	gelförmig $L_{\beta'}$	1	2.65 fs	150 ps
		2	0.8 fs	12 ps
		3	6 fs	0.7 ps
11°C	zackig $P_{\beta'}$	1	2.3 fs	150 ps
		2	0.7 fs	11 ps
26°C	flüssig-kristallin L_{α}	1	3.98 fs	155 ps
		2	1.25 fs	7.5 ps
30°C	flüssig-kristallin L_{α}	1	2.98 fs	150 ps
		2	0.9 fs	8 ps

Tabelle 6.4: Parameter zur Anpassung der temperaturabhängigen 3-PEPS-Signale von DiDC₁₈ in DMPC gemäß Gleichung 6.3.

Die Langzeitkomponente τ_1 liegt in allen Messungen bei etwa 150 ps. Eine genaue Zuordnung ist, wie oben bereits mehrfach diskutiert, nicht möglich. Die Zeitkonstante τ_2 wird der Rotationsdiffusion individueller Wassermoleküle zugeordnet, deren Relaxationszeit mehrere Pikosekunden beträgt. Dieser Freiheitsgrad der Wassermoleküle ist somit in allen Phasen gleichermaßen an der Solvation beteiligt.

Wie bereits erwähnt, mußte die 3-PEPS-Kurve der gelförmigen Phase mit einer dritten exponentiellen Komponente angepasst werden. Zusätzlich zu den Zeitkonstanten im Pikosekundenbereich erscheint eine Relaxationszeit von $\tau_3 = 700$ fs, die mit einer großen Amplitude einhergeht. Es ist durchaus erstaunlich, dass sich die Solvationsdynamik beim Übergang von der zackigen Phase $P_{\beta'}$ zur gelförmigen Phase $L_{\beta'}$ derart drastisch ändert. Demgegenüber bleibt der Peakshift durch den Hauptphasenübergang unverändert. Es stellt sich daher die Frage, ob diese neue Zeitkonstante spezifisch für die gelförmige Phase ist und ob das Auftreten dieser dritten Zeitkonstanten mit strukturellen Änderungen am Vorphasenübergang verknüpft ist. Bemerkenswerterweise ist die 3-PEPS-Messung in der gelförmigen Phase sehr ähnlich zu der in wässrigen Volumenphasen (siehe Abbildung 6.11). Zur Klärung dieses Sachverhalts werden Messungen an weiteren Membranen vorgestellt.

6.4.3.2 Temperaturabhängigkeit der Solvationsdynamik an der DOPC-Wasser-Grenzschicht

Analog zu Kapitel 6.4.3.1 wird nun die Temperaturabhängigkeit von DiDC_{18} in DOPC beschrieben. Abbildung 6.22 zeigt die 3-PEPS-Messungen bei 6°C, 11°C und 20°C in doppelt und einfach logarithmierter Darstellung. Die Hauptphasenübergangstemperatur von DOPC liegt bei -18°C, so dass sich DOPC bei allen drei Messungen in der flüssig-kristallinen Phase befindet. Die dargestellten 3-PEPS-Kurven sind mit einer Funktion angepasst, die sich aus der Summe zweier Exponentialfunktionen zusammensetzt. Die Zeitkonstante für den langsamen, quasi-statischen Anteil der Solvationsfunktion beträgt 400 ps, während der größte Anteil der verbleibenden 3-PEPS-Kurve mit einer Zeitkonstante von 9 ps angepasst werden kann. Die Relaxationszeit von 9 ps entspricht auch hier der Rotationsdiffusion individueller Wassermoleküle.

Abbildung 6.22: 3-PEPS-Kurven von DiDC_{18} in DOPC/Wasser bei den Temperaturen 6°C, 11°C und 20°C inklusive einer biexponentiellen Anpassungsfunktion

i	A_i	τ_i
1	1.2 fs	400 ps
2	1.4 fs	9 ps

Tabelle 6.5: Zusammenstellung der ermittelten Parameter gemäß Gleichung 6.3 von DiDC₁₈ in DOPC/Wasser.

Diese Messungen zeigen, dass in der flüssig-kristallinen Phase des DOPCs der Freiheitsgrad der Rotationsdiffusion individueller Wassermoleküle zur Solvation beiträgt, jedoch keine kollektiven Translationsmoden vorhanden sind. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen aus der flüssig-kristallinen Phase des DMPC. Dieser Befund unterstreicht, dass die Struktur des Wassers an der Grenzschicht von Phospholipid-Vesikeln in der flüssig-kristallinen Phase sich stark von der des reinen Wassers unterscheidet. Diese Messungen zeigen darüber hinaus, dass keine ausgeprägten Veränderungen der Solvationsdynamik bei einer Temperaturänderung von 6°C auf 11°C bei DOPC-Vesikeln stattfindet. Die Ursache für die Änderung der Solvationsdynamik bei DMPC-Vesikeln ist somit bei der sich wandelnden Struktur am Vorphasenübergang zu suchen. In diesem Fall sollten auch bei anderen Lipidsorten deutliche Veränderungen am Vorphasenübergang auftreten. Aus diesem Grund wird die Solvationsdynamik an der Grenzschicht von DPPC-Vesikeln zu Wasser untersucht.

6.4.3.3 Temperaturabhängigkeit der Solvationsdynamik an der DPPC-Wasser-Grenzschicht

Temperaturabhängige 3-PEPS-Messungen wurden an dem System DiDC₁₈/DPPC/Wasser bei 6°C, 20°C, 30°C und 35°C durchgeführt. In Abbildung 6.23 ist eine Wärmekapazitätsmessung von DPPC-Vesikeln, die mit dem Farbstoff DiDC₁₈ markiert sind, dargestellt. Mit den Pfeilen sind die Temperaturen bei denen die verschiedenen 3-PEPS-Messung durchgeführt wurden gekennzeichnet. Bei den Messungen bei 6°C, 20°C und 30°C befinden sich die DPPC-Vesikel demnach in der gelförmigen Phase L_{β'}, während die Messung bei 35°C die Solvationsdynamik an der Grenzschicht der DPPC-Vesikel in der zackigen Phase P_{β'} bestimmt.

Abbildung 6.23: Temperaturabhängige Wärmekapazität von DPPC-Vesikeln; mit Pfeilen sind die Temperaturen der durchgeführten 3-PEPS-Experimenten gekennzeichnet.

Die Messkurven der 3-PEPS-Experimente sind in Abbildung 6.24 aufgetragen. Für die Anpassung der Solvationsdynamik in der gelförmigen Phase sind jeweils drei exponentiell abklingende Terme der Summe in Gleichung 6.3 notwendig, während zwei ausreichen, um die Dynamik in der zackigen Phase zu beschreiben. Die Amplituden A_i und Abklingzeiten τ_i der Anpassungsfunktion $I(t_{23})$ sind in der Tabelle 6.6 zusammengestellt.

Wie auch bei den beiden zuvor beschriebenen Systemen beobachtet werden konnte, tritt bei DiDC₁₈ in DPPC-Vesikeln eine exponentielle Langzeitkomponente von $\tau_1 = 160$ ps auf, die aus den bereits diskutierten Gründen (Boxchargeometrie) fehlerbehaftet ist.

Die Zeitkonstante von $\tau_2 = 11$ ps wird gemäß vorheriger Diskussion der Messungen an den Grenzschichten von DMPC- und DOPC-Vesikeln der Rotationsdiffusion individueller Wassermoleküle zugeschrieben.

Abbildung 6.24: 3-PEPS-Kurven an der Grenzschicht von DPPC-Vesikeln zu Wasser bei den Temperaturen 6°C, 20°C, 30°C und 35°C. Die einzelnen Messungen sind der Übersichtlichkeit wegen in ihrem Peakshift relativ zueinander verschoben. Die gestrichelt gezeichneten Kurven geben eine biexponentielle Anpassung wieder, während die durchgezogene gezeichnete Linie einer triexponentiellen Anpassung entspricht.

Temperatur	Lipidphase	i	A_i	τ_i
6°C	gelförmig $L_{\beta'}$	1	1.55 fs	160 ps
		2	1 fs	11 ps
		3	1.7 fs	1.5 ps
20°C	gelförmig $L_{\beta'}$	1	2.3 fs	160 ps
		2	1.3 fs	11 ps
		3	1.3 fs	1 ps
30°C	gelförmig $L_{\beta'}$	1	2.65 fs	160 ps
		2	1 fs	11 ps
		3	3.5 fs	0.7 ps
35°C	zackig $P_{\beta'}$	1	1.9 fs	160 ps
		2	0.85 fs	11 ps

Tabelle 6.6: Parameter zur Anpassung der temperaturabhängigen 3-PEPS-Signale von DiDC₁₈ in DPPC/Wasser gemäß Gleichung 6.3

Interessanterweise tritt auch in diesem System eine Zeitkonstante um 1 ps in der gelförmigen Phase auf. Die Zusammenstellung der Messungen in DMPC, DOPC und DPPC belegt deutlich, dass das Auftreten dieser Zeitkonstanten im Zusammenhang mit dem Vorphasenübergang stehen muss (Kapitel 3.3.4). Obwohl viele Fragen bezüglich des Vorphasenübergangs noch ungeklärt sind, ist trotzdem eindeutig belegt, dass er mit einer Veränderung der Kopfgruppenanordnung einhergeht. Dies ist daher mit der Abnahme der Hydratisierung beim Übergang von der zackigen Phase $P_{\beta'}$ zur gelförmigen Phase $L_{\beta'}$ (Kapitel 3.3.6) verknüpft. Demgegenüber ist der Hauptphasenübergang mit dem „Schmelzen“ der aliphatischen Ketten verbunden. Wegen dieser unterschiedlichen strukturdynamischen Phänomene am Vorphasen- und Hauptphasenübergang, ist es nicht erstaunlich, dass sich die Solvationsdynamik an der Grenzschicht am Vorphasenübergang stärker ändert als am Hauptphasenübergang. Beim Vergleich der in diesem Kapitel vorgestellten Messungen mit denen in der wässrigen Volumenphase (Kapitel 6.3) treten folgende Ähnlichkeiten auf:

Das temperaturabhängige Verhalten der schnellen Zeitkonstanten τ_3 im Bereich von 1 ps ist bei DiDC₁₈ in DPPC vergleichbar mit dem in Wasser. Diese Zeitkonstanten wurden in die in Kapitel 6.3.2 verwendete Arrhenius-Auftragung (Abbildung 6.16 b.)) eingefügt.

Abbildung 6.25 stellt also die temperaturabhängigen Relaxationszeiten des Chromophors in Wasser und in DPPC/Wasser dar und vergleicht diese mit den Zeitkonstanten, die aus depolarisierten Raman-Daten und Messungen des optischen Kerr-Effektes der reinen Flüssigkeit ermittelt wurden. Die Abbildung zeigt eine gute Übereinstimmung aller Zeitkonstanten. Diese nur in der gelförmigen Phase auftretende Zeitkonstante kann somit den gehinderten kollektiven Translationsmoden des reinen Wassers zugeordnet werden.

Abbildung 6.25: Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstante τ_3 bei Messungen in der gelförmigen Phase L_β an der DPPC-Wasser-Grenzschicht kombiniert mit den Zeitkonstanten aus depolarisierten Raman- und OKE-Messungen.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser weiteren Zeitkonstanten besteht in dem durch die Dehydratisierung hervorgerufenen „Herausdrängen“ des Chromophors aus dem Grenzschichtbereich. In diesem Fall würde der Farbstoff in den Bereich der Wasservolumenphase hineinragen und, wie in den Experimenten

beobachtet wurde, als Sensor für die Solvatationsdynamik von reinem ungestörtem Wasser dienen. Trotzdem bleibt der Farbstoff weiterhin durch die langen aliphatischen Ketten in der Lipiddoppelschicht verankert. Unterstützt wird diese Annahme von der erhöhten Packungsdichte der gelförmigen Phase $L_{\beta'}$ im Vergleich zur zackigen Phase $P_{\beta'}$. Diese Interpretation erklärt die Tatsache, dass eine sehr ähnliche Solvatationsdynamik in der zackigen und flüssig-kristallinen Phase vorliegt, da am Hauptphasenübergang keine Dehydratisierung sondern vielmehr ein Schmelzen der aliphatischen Ketten im Innern der Doppelschicht stattfindet. Der Chromophor befindet sich jedoch an den Kopfgruppen und ist somit, wie anhand der Messungen gezeigt werden konnte, nur für Veränderungen im Kopfgruppenbereich sensitiv.

7 AUSBLICK

Die hier durchgeführten Experimente geben erste Einblicke in die Solvation an Lipidmembran-Wasser-Grenzschichten. Die Isolation der grenzschicht-spezifischen Solvationsdynamik gelingt durch einen Vergleich mit der eines identischen Chromophors in wässriger Volumenphase. Im zuletzt genannten Fall entwickelt sich die Dynamik im Wesentlichen auf zwei Zeitskalen: etwa 1 ps für die Relaxation kollektiver gehinderter Translationsmoden, charakteristisch für das zufällige, ungestörte Wasserstoffbrückennetzwerk der reinen Flüssigkeit und etwa 10 ps für die diffusive Reorientierungsdynamik. Dagegen erfolgt die Solvation an wässrigen Phospholipidmembran-Grenzschichten nur auf einer Zeitskala von mehreren Piko-sekunden. Der Vergleich zeigt, dass das für reines Wasser charakteristische Wasserstoffbrückennetzwerk an der Oberfläche dieser Grenzschicht aufgehoben ist. Die ablaufenden ultraschnellen Dynamiken im Bereich der Lipidmembrane sind mit Ausnahme der in dieser Arbeit diskutierten Ergebnissen noch unverstanden. Es eröffnet sich daher ein völlig neues Forschungsgebiet.

Die Photon-Echo-Spektroskopie erlaubt im Zusammenspiel mit lokalisierten Farbstoffsensoren die Solvation in allen Regionen der Membran zu untersuchen. Durch derartige Messungen können molekulardynamische Berechnungen überprüft und verfeinert werden.

Eine wichtige Funktion von biologischen Membranen ist die Trennung zwischen inneren und äußeren Regionen der Zelle. Ionen sind nicht in der Lage diese Barriere beliebig zu durchdringen. Lediglich durch Ionenkanäle können Ionen selektiv aus der Zelle heraus oder in die Zelle hinein gelangen. Mit Hilfe der Photon-Echo-Spektroskopie könnten neue detaillierte Einblicke in die Dynamik dieses Ionentransportes gewonnen werden. Die hohe Zeit- und Ortsauflösung macht diese Art der Spektroskopie zu einem brauchbaren Werkzeug, um die Solvationsdynamik mittels eines Farbstoffs über den gesamten Bereich des Ionenkanals zu messen.

In Bezug auf das gestörte Wasserstoffbrückennetzwerk ist es von besonderem Interesse eine Serie von Farbstoffen zu synthetisieren, die die Solvationsdynamik im Bereich direkt an den Kopfgruppen bis hin zur Region des reinen ungestörten Wassers gezielt auflöst. Ein Phosphatidylcholinlipid, das einen kovalent an die Kopfgruppe gebundenen Chromophor besitzt, könnte hierzu eingesetzt werden. Das

in dieser Arbeit verwendete Indocarbocyanin ist ein dafür gut geeigneter Chromophor, da er einen großen Extinktionskoeffizient besitzt. Der variable Abstand könnte durch eine variable aber starre Brücke, die über eine kovalente Bindung die Phosphatidylcholkopfgruppe mit dem Farbstoff verknüpft, eingestellt werden.

Des Weiteren ist eine Verbesserung der Messtechnik wünschenswert, um die gesamte Solvatationskorrelationsfunktion analysieren zu können. Um dies umsetzen zu können ist es notwendig, einerseits den Inertialteil aufzulösen und andererseits die langen Zeitkonstanten im Bereich der Rotationskorrelationszeit des Farbstoffes und den kollektiven Rotationen von Wasser genauer zu bestimmen.

Die Probleme im Bereich der inertialen Umgebungsdynamik resultieren aus der fehlenden Sensitivität der 3-PEPS-Messung in Bezug auf den schnellen Anteil der Solvatationskorrelationsfunktion M'_{fast} (siehe Kapitel 4.5). Ein Experiment, das zur Bestimmung dieser ultraschnellen Komponente bereits genutzt wird, ist das „time-gated“ 3-Puls-Echo [75, 189]. Die Durchführung dieser Experimente in Küvetten wird jedoch erschwert, da das Echosignal durch das Austrittsfenster zeitlich dispergiert wird. Die bisherigen „time-gated“ 3-PE Experimente wurden in schnellfließenden Jets durchgeführt. Für biologische Systeme muss daher nach eine Methode gesucht werden, die trotz des kleinen Probenvolumens eine Messung des „time-gated“ 3-PE erlaubt.

Die Interpretation der Zeitkonstanten im Bereich von einigen 100 ps war in dieser Arbeit nicht möglich, da die Solvatationskorrelationsfunktion auf Grund des experimentellen Aufbaus lediglich bis zu einer Verzögerung $t_{23} = 300$ ps gemessen werden konnte. Eine Verlängerung der Verzögerungsstrecke könnte helfen, diese langsamen Dynamiken zu beschreiben. Die maximale Verzögerungszeit für die 3-PEPS-Experiment wird entscheidend von der Fluoreszenzlebensdauer des eingesetzten Farbstoffes geprägt, da die Intensität des Signals mit der Zeitkonstante der Fluoreszenzlebensdauer abklingt. Des Weiteren ist es für die genaue Bestimmung dieser langsamen Zeitkonstante wichtig, den Peakshift möglichst genau zu bestimmen, da der Peakshift zu langen Zeiten nahe zu null ist. In diesem Zusammenhang ist es notwendig das Signal-Rauschverhältnis weiter zu verbessern. Neben den Optionen im Bereich der Lipidmembranen bietet sich die Photon-Echo-Spektroskopie an, die Solvatationsdynamik auch in anderen biologischer System zu bestimmen. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden ist eine genaue Charakterisierung der Solvatationsfunktion für Zeiten zwischen 80 fs bis zu ungefähr

50 ps möglich. Insbesondere die Rotationskorrelationszeit und die gehinderte kollektive Translation des Wassers konnte mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Experimente zur Bestimmung der Solvatationsdynamik des Wasser in anderen biologischen Bereichen bieten sich daher an. Einige Systeme wurden, wie bereits erwähnt, schon untersucht. Diesen Experimenten fehlte es jedoch häufig an einer guten Ortsauflösung der Solvatationsdynamik, da die Position des Farbstoffes nur ungenau bekannt war [7, 8]. Mit dem in diesen Experimenten benutzten Farbstoff, der sich durch seine langen Ketten an einem wohldefinierten Ort aufhält, sollte es möglich sein schon untersuchte Systeme, wie das Wasser in inversen Mizellen [7], noch genauer zu charakterisieren.

Ein biologisch relevantes Beispiel in dem Grenzschichten zu Wasser eine Rolle spielen sind Proteine. Die Funktion der Proteine, unter anderem der Einfluss der tertiären Struktur, werden zur Zeit intensiv untersucht. Um ihre Strukturen und damit die Wirkungsweise der Proteine zu verstehen, ist eine Charakterisierung des Wassers in den verschiedenen Bereichen des Proteins notwendig. Photon-Echo-Experimente an markierten Proteinen in wässriger Lösung bieten sich auf Grund ihrer Ortsauflösung an. Die Dynamik des Protein umgebenden Wassers könnte auch in Abhängigkeit vom Zustand (gefaltet oder entfaltet) des Proteins untersucht werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente haben gezeigt, dass die Photon-Echo-Spektroskopie ein Werkzeug zur Aufklärung von Solvatationsdynamiken in biologischen Grenzschichten ist. Ihre Möglichkeiten scheint zur Zeit lediglich durch die photchemischen und photophysikalischen Eigenschaften der zur Verfügung stehenden Farbstoffe begrenzt zu sein.

8 ANHANG

8.1 Synthese von 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyaninchlorid

8.1.1 4-Chlorbenzolsulfonsäureoctadecylester

Edukte: 0.75 mol Stearylalkohol; 0.87 mol Triethylamin;
1 mol p-Chlorbenzolsulfonsäurechlorid

Durchführung:

Eine Mischung aus 203 g (0.75 mol) Stearylalkohol, 120 ml (0.87 mol) Triethylamin und 800 ml Dichlormethan wurde nach dem Erwärmen bis zur Klärung bei Zimmertemperatur unter Rühren mit einer Lösung von 211 g (1 Mol) p-Chlorbenzolsulfonsäurechlorid tropfenweise versetzt.

Nach 24-stündigem Rühren wurde das Filtrat mehrmals mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt.

$\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{ClO}_3\text{S}$ (445.11)

Fp.Lit.: 63-64°C.

8.1.2 2,3,3-Trimethyl-1-octadecyl-3H-indolium-4-chlorbenzoat

Edukte: 0.15 mol 2,3,3-Trimethyl-3H-indol;

0.15 mol 4-Chlorobenzolsulfonsäureoctadecylester

Durchführung:

25 g (0.15 mol) 2,3,3-Trimethyl-3H-indol und 67 g (0.15 mol) 4-Chlorobenzolsulfonsäureoctadecylester wurden in einem 500 ml Kolben unter Stickstoffatmosphäre 2 Stunden bei 220°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit 250 ml Ethylacetat versetzt. In violetter Lösung bildete sich ein weißer Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert und in Ethylacetat gewaschen und anschließend aus 300 ml Ethylacetat umkristallisiert.

$C_{35}H_{54}ClNO_3S$ (604.34)

Fp.Lit.: 89-91°C.

8.1.3 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyaninchlorid

Edukte: 0.02 mol 2,3,3-Trimethyl-1-octadecyl-3H-indolium-4-chlorbenzoat;
0.01 mol 3-Anilinoacrylaldehyde-anil

Durchführung:

12.1 g (0.02 mol) 2,3,3-Trimethyl-1-octadecyl-3H-indolium-4-chlorbenzoat, 2.22 g (0.01 mol) 3-Anilinoacrylaldehyde-anil und 2 g Natriumacetat wurden in 60 ml Essigsäureanhydrid 1 Stunde unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 60 ml Wasser zu dem Gemisch hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stengelassen. Es bildete sich ein zähes dunkles Produkt neben einer hellbrauner Wasserphase. Das Wasser wurde entfernt und der Rückstand in Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Rückstand in 50 ml 2-Propanol gelöst. Das tiefblaue Filtrat wurde abfiltriert und unter Vakuum getrocknet.

$\text{C}_{61}\text{H}_{99}\text{ClN}_2$ (895.92).

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Hutterer, F. W. Schneider, H. Sprinz, M. Hof, Binding and Relaxation Behaviour of Prodan and Patman in Phospholipid Vesicles - a Fluorescence and ^1H -NMR Study, *Biophysical Chemistry* 61 (1996) 151-160.
- [2] R. Hutterer, A. B. J. Parusel, M. Hof, Solvent Relaxation of Prodan and Patman: A useful Tool for the Determination of Polarity and Rigidity Changes in Membranes, *Journal of Fluorescence* 8 (1998) 389-393.
- [3] A. Datta, S. K. Pal, D. Mandal, K. Bhattacharyya, Solvation Dynamics of Coumarin 480 in Vesicles, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 6114-6117.
- [4] K. Bhattacharyya, B. Bagchi, Slow dynamics of constrained water in complex geometries [Review], *Journal of Physical Chemistry* 104 (2000) 10603-10613.
- [5] S. K. Pal, D. Sukul, D. Mandal, S. Sen, K. Bhattacharyya, Solvation Dynamics of DCM in Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Lipid, *Tetrahedron* 56 (2000) 6999-7002.
- [6] S. K. Pal, D. Sukul, D. Mandal, K. Bhattacharyya, Solvation Dynamics of DCM in Lipid, *Journal of Physical Chemistry B* 104 (2000) 4529-4531.
- [7] S. K. Pal, D. Sukul, D. Mandal, S. Sen, K. Bhattacharyya, Solvation Dynamics of DCM in Micelles, *Chemical Physics Letters* 327 (2000) 91-96.
- [8] S. K. Pal, D. Mandal, D. Sukul, S. Sen, K. Bhattacharyya, Solvation Dynamics of DCM in Human Serum Albumin, *Journal of Physical Chemistry B* 105 (2001) 1438-1441.
- [9] N. Nandi, K. Bhattacharyya, B. Bagchi, Dielectric Relaxation and Solvation Dynamics of Water in Complex Chemical and Biological Systems [Review], *Chemical Reviews* 100 (2000) 2013-2045.
- [10] N. E. Levinger, Ultrafast Dynamics in Reverse Micelles, Microemulsions, and Vesicles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5 (2000) 118-124.
- [11] R. E. Riter, D. M. Willard, N. E. Levinger, Water Immobilization at Surfactant Interfaces in Reverse Micelles, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 2705-2714.
- [12] D. Pant, R. E. Riter, N. E. Levinger, Influence of Restricted Environment and Ionic Interactions on Water Solvation Dynamics, *Journal of Chemical Physics* 109 (1998) 9995-10003.

- [13] G. Cevc, D. Marsh, *Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models*, John Wiley & Sons, New York 1987.
- [14] R. Dimova, C. Dietrich, A. Hadjiisky, K. Danov, B. Pouligny, Falling Ball Viscosimetry of Giant Vesicle Membranes: Finite-Size Effects, *European Physical Journal B* 12 (1999) 589-598.
- [15] R. Dimova, B. Pouligny, C. Dietrich, Pretransitional Effects in Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicle Membranes: Optical Dynamometry Study, *Biophysical Journal* 79 (2000) 340-356.
- [16] D. G. Hunter, B. J. Frisken, Effect of Extrusion Pressure and Lipid Properties On the Size and Polydispersity of Lipid Vesicles, *Biophysical Journal* 74 (1998) 2996-3002.
- [17] R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. M. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L.-R. Hu, Small-Volume Extrusion Apparatus for Preparation of Large Unilamellar Vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta* 1061 (1991) 297-303.
- [18] F. Bordi, C. Cametti, A. Naglieri, Ionic Transport in Lipid Bilayer Membranes, *Biophysical Journal* 74 (1998) 1358-1370.
- [19] A. Srivastava, K. B. Eisenthal, Kinetics of Molecular Transport Across a Liposome Bilayer, *Chemical Physics Letters* 292 (1998) 345-351.
- [20] A. Jutila, P. K. J. Kinnunen, Novel Features of the Main Transition of Dimyristoylphosphocholine Bilayers Revealed By Fluorescence Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry B* 101 (1997) 7635-7640.
- [21] T. Heimburg, U. Würz, D. Marsh, Binary Phase Diagram of Hydrated Dimyristoylglycerolphosphatidylcholine Mixtures, *Biophysical Journal* 63 (1992) 1369-1378.
- [22] S. Matuoka, S. Kato, I. Hatta, Temperature Change of the Ripple Structure in Fully Hydrated Dimyristoylphosphatidylcholine/Cholesterol Multibilayers, *Biophysical Journal* 67 (1994) 728-736.
- [23] T. Parasassi, M. Di Stefano, M. Loiero, G. Ravagnan, E. Gratton, Cholesterol Modifies Water Concentration and Dynamics in Phospholipid Bilayers: A Fluorescence Study Using Laurdan Probe, *Biophysical Journal* 66 (1994) 763-768.

- [24] T. Parasassi, M. Di Stefano, M. Loiero, G. Ravagnan, E. Gratton, Influence of Cholesterol on Phospholipid Bilayers Phase Domains as Detected by Laurdan Fluorescence, *Biophysical Journal* 66 (1994) 120-132.
- [25] D. P. Tieleman, S. J. Marrink, H. J. C. Berendsen, A Computer Perspective of Membranes: Molecular Dynamics Studies of Lipid Bilayer Systems, *Biochimica et Biophysica Acta* 1331 (1997) 235-270.
- [26] S. Berneche, M. Nina, B. Roux, Molecular Dynamics Simulation of Melittin in a Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Membrane, *Biophysical Journal* 75 (1998) 1603-1618.
- [27] A. Tardieu, V. Luzzati, Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases, *Journal of Molecular Biology* 75 (1973) 711-733.
- [28] H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell, Preferred Conformation and Molecular Packing of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine, *Biochimica et Biophysica Acta* 1981 (1981) 21-51.
- [29] R. N. A. H. Lewis, N. Mak, R. N. McElhaney, A Differential Scanning Calorimetric Study of the Thermotropic Phase Behavior of Model Membranes Composed of Phosphatidylcholines Containing Linear Saturated Fatty Acyl Chains, *Biochemistry* 26 (1987) 6118-6126.
- [30] S. C. Chen, J. M. Sturtevant, B. J. Gaffney, Scanning Calorimetric Evidence for a third Phase Transition in Phosphatidylcholine Bilayers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (1980) 5060-5063.
- [31] S. Utoh, Split in Subtransition of Phospholipid Bilayer under High Pressure, *Journal of Chemical Physics* 106 (1997) 728-731.
- [32] H. H. Földner, Characterization of a Third Phase Transition in Multilamellar Dipalmitoyllecithin Liposomes, *Biochemistry* 20 (1981) 5707-5710.
- [33] S. Utoh, N. Okubo, Subtransition of Multilamellar L- α Dibehenoyl ($C_n = 22$) Phosphatidylcholine, *Japanese Journal of Applied Physics* 40 (2001) 5019-5025.
- [34] M. J. Ruocco, G. G. Shipley, Characterization of the Sub-Transition of Hydrated Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: Kinetics, Hydration and Structural Study, *Biochimica et Biophysica Acta* 691 (1982) 309-320.

- [35] M. J. Ruocco, G. G. Shipley, Characterization of the Sub-Transition of Hydrated Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: x-Ray Diffraction Study, *Biochimica et Biophysica Acta* 684 (1982) 59-66.
- [36] I. Trahms, W. D. Klabe, E. Boroske, ^1H -NMR Study of the Three Low Temperature Phases of DPPC-Water Systems, *Biophysical Journal* 42 (1983) 285-293.
- [37] A. L. MacKay, A Proton NMR Moment Study of the Gel and Liquid-Crystalline Phases of Dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biophysical Journal* 35 (1981) 301-313.
- [38] D. G. Cameron, H. L. Casal, E. F. Gudgin, H. H. Mantsch, The Gel Phase of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine: An Infrared Characterization of the Acyl Chain Packing, *Biochimica et Biophysica Acta* 596 (1980) 463-467.
- [39] E. Boroske, L. Trahms, A ^1H and ^{13}C NMR Study of Motional Changes of Dipalmitoyl Lecithin Associated with the Pretransition, *Biophysical Journal* 42 (1983) 275-283.
- [40] D. Marsh, Molecular Motion in Phospholipid Bilayers in Gel Phase: Long Axis Rotation, *Biochemistry* 19 (1980) 1632-1637.
- [41] G. Cevc, How Membrane Chain-Melting Phase-Transition Temperature is Affected by the Lipid Chain Asymmetry and Degree of Unsaturation : An Effective Chain -Length Model, *Biochemistry* 30 (1991) 7186-7193.
- [42] D. Marsh, Analysis of the Chainlength Dependence of Lipid Phase Transition Temperatures: Main and Pretransitions of Phosphatidylcholines: Main and Non-Lamellar Transitions of Phosphatidylethanolamines, *Biochimica et Biophysica Acta* 1062 (1991) 1-6.
- [43] M. J. Janiak, D. M. Small, G. G. Shipley, Nature of the Thermal Pretransition of Synthetic Phospholipids: Dimyristoyl- and Dipalmitoyllecithin, *Biochemistry* 15 (1976) 4575-4580.
- [44] M. J. Janiak, D. M. Small, G. G. Shipley, Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin, *The Journal of Biological Chemistry* 254 (1978) 6068-6078.
- [45] Y. Inoko, T. Mitsui, Structural Parameters of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Lamellar Phases and Bilayer Phase Transitions, *Journal of the Physical Society of Japan* 44 (1978) 1918-1924.

- [46] B. A. Cunningham, A. D. Brown, D. H. Wolfe, W. P. Williams, A. Brain, Ripple Phase Formation in Phosphatidylcholine - Effect of Acyl Chain Relative Length, Position, and Unsaturation, *Physical Review A* 58 (1998) 3662-3672.
- [47] M. F. Schneider, D. Marsh, W. Jahn, B. Kloesgen, T. Heimburg, Network Formation of Lipid Membranes: Triggering Structural Transitions by Chain Melting, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999) 14312-14317.
- [48] J. Stamatoff, B. Feuer, H. J. Guggenheim, G. Tellez, T. Yamane, Amplitude of Rippling in the P_{β} Phase of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers, *Biophysical Journal* 38 (1982) 217-226.
- [49] R. P. Rand, D. Chapman, K. Larsson, Tilted Hydrocarbon Chains of Dipalmitoyl Lecithin become Perpendicular to the Bilayer before Melting, *Biophysical Journal* 15 (1975) 1117-1124.
- [50] T. Le Bihan, M. Pezolet, Study of the Structure and Phase Behavior of Dipalmitoylphosphatidylcholine by Infrared Spectroscopy - Characterization of the Pretransition and Subtransition, *Chemistry & Physics of Lipids* 94 (1998) 13-33.
- [51] D. G. Cameron, H. L. Casal, H. H. Mantsch, Characterization of the Pretransition in 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biochemistry* 19 (1980) 3665-3672.
- [52] D. G. Cameron, H. L. Casal, H. H. Mantsch, The Thermotropic Behavior of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Bilayers, *Biophysical Journal* 35 (1981) 1-16.
- [53] J. F. Nagle, D. A. Wilkinson, Lecithin Bilayers Density Measurements and Molecular Interactions, *Biophysical Journal* 23 (1978) 159-175.
- [54] D. W. McClure, Nature of the Rotational Phase Transition in Paraffin Crystals, *Journal of Chemical Physics* 49 (1968) 1830-1839.
- [55] G. Cevc, Polymorphism of the Bilayer Membranes in the Ordered Phase and the Molecular Origin of the Lipid Pretransition and Rippled Lamellae, *Biochimica et Biophysica Acta* 1062 (1991) 59-69.
- [56] M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, A. Kusumi, Hydrogen Bonding of Water to Phosphatidylcholine in the Membrane as Studied by a Molecular Dynamics Simulation - Location, Geometry, and Lipid-Lipid Bridging via Hydrogen-Bonded Water, *Journal of Physical Chemistry* 101 (1997) 3677-3691.

- [57] M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, A. Kusumi, Charge Pairing of Headgroups in Phosphatidylcholine Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study, *Biophysical Journal* 76 (1999) 1228-1240.
- [58] M. Pasenkiewicz-Gierula, T. Rog, Conformations, Orientations and Time Scales Characterising Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Membrane - Molecular Dynamics Simulation Studies, *Acta Biochimica Polonica* 44 (1997) 607-624.
- [59] J. J. L. Cascales, H. J. C. Berendsen, J. G. Delatorre, Molecular Dynamics Simulation of Water between two Charged Layers of Dipalmitoylphosphatidylserine, *Journal of Physical Chemistry* 100 (1996) 8621-8627.
- [60] I. Z. Zubrzycki, Y. Xu, M. Madrid, P. Tang, Molecular Dynamics Simulations of a Fully Hydrated Dimyristoylphosphatidylcholine Membrane in Liquid-Crystalline Phase, *Journal of Chemical Physics* 112 (2000) 3437-3441.
- [61] H. Heller, M. Schaefer, K. Schulten, Molecular Dynamics Simulation of a Bilayer of 200 Lipids in the Gel and the Liquid-Crystal Phases, *Journal of Physical Chemistry* 97 (1993) 8343-8360.
- [62] Y. Takaoka, M. Pasenkiewicz-Gierula, H. Miyagawa, K. Kitamura, Y. Tamura, A. Kusumi, Molecular Dynamics Generation of Nonarbitrary Membrane Models reveals Lipid Orientational Correlations, *Biophysical Journal* 79 (2000) 3118-3138.
- [63] F. Zhou, K. Schulten, Molecular Dynamics Study of a Membrane - Water Interface, *Journal of Physical Chemistry* 99 (1995) 2194-2207.
- [64] E. H. Alper, D. Bassolino-Klimas, T. R. Stouch, The Limiting Behavior of Water Hydrating a Phospholipid Monolayer: A Computer Simulation Study, *Journal of Chemical Physics* 99 (1993) 5547-5559.
- [65] E. H. Alper, D. Bassolino, T. R. Stouch, Computer Simulation of a Phospholipid Monolayer-Water System: The Influence of Long Forces on Water Structure and Dynamics, *Journal of Chemical Physics* 98 (1993) 9798-9807.

- [66] W. Shinoda, M. Shimizu, S. Okazaki, Molecular Dynamics Study on Electrostatic Properties of a Lipid Bilayer - Polarization, Electrostatic Potential, and the Effects on Structure and Dynamics of Water near the Interface, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 6647-6654.
- [67] R. Kubo, in D. T. Haar (Ed.): *Fluctuation Relaxation and Resonance in Magnetic Systems*, Oliver and Boyd, Edinburgh 1962, 23-68.
- [68] R. Kubo, A Stochastic Theory of Line Shape, *Advances in Chemical Physics* 15 (1969) 101-127.
- [69] R. Kubo, M. Toda, N. Hashitsume, *Statistical Physics*, Springer Verlag, Berlin 1991.
- [70] J. L. Doob, The Brownian Movement and Stochastic Equations, *Annals of Mathematics* 43 (1942) 351-369.
- [71] E. Hanamura, Stochastic Theory of Coherent Optical Transients, *Journal of the Physical Society of Japan* 52 (1983) 2258-2266.
- [72] S. Mukamel, *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*, Oxford University Press, New York 1995.
- [73] S. Mukamel, V. Rupasov, Energy Transfer, Spectral Diffusion, and Fluorescence of Molecular Aggregates - Brownian Oscillator Analysis, *Chemical Physics Letters* 242 (1995) 17-26.
- [74] W. P. de Boeij, M. S. Pshenichnikov, D. A. Wiersma, On the Relation Between the Echo-Peak Shift and Brownian-Oscillator Correlation Function, *Chemical Physics Letters* 253 (1996) 53-60.
- [75] W. P. de Boeij, M. S. Pshenichnikov, D. A. Wiersma, System-Bath Correlation Function Probed By Conventional and Time-Gated Stimulated Photon Echo [Review], *Journal of Physical Chemistry* 100 (1996) 11806-11823.
- [76] W. P. de Boeij, Ultrafast Solvation Dynamics Explored by Nonlinear Optical Spectroscopy, Dissertation, Groningen 1997 .
- [77] K. F. Everitt, E. Geva, J. L. Skinner, Determining the Solvation Correlation Function from Three-Pulse Photon Echoes in Liquids, *Journal of Chemical Physics* 114 (2001) 1326-1335.
- [78] R. Agarwal, B. P. Krueger, G. D. Scholes, M. Yang, J. Yom, L. Mets, G. R. Fleming, Ultrafast Energy Transfer in LHC-II Revealed by Three-Pulse Photon Echo Peak Shift Measurements, *Journal of Physical Chemistry B* 104 (2000) 2908-2918.

- [79] X. J. Jordanides, M. J. Lang, X. Y. Song, G. R. Fleming, Solvation Dynamics in Protein Environments Studied by Photon Echo Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry B* 103 (1999) 7995-8005.
- [80] B. J. Homoelle, M. D. Edington, W. M. Diffey, W. F. Beck, Stimulated Photon-Echo and Transient-Grating Studies of Protein-Matrix Solvation Dynamics and Interexciton-State Radiationless Decay in α -Phycocyanin and Allophycocyanin, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 3044-3052.
- [81] T. H. Joo, Y. W. Jia, J. Y. Yu, M. J. Lang, G. R. Fleming, Third-Order Nonlinear Time Domain Probes of Solvation Dynamics [Review], *Journal of Chemical Physics* 104 (1996) 6089-6108.
- [82] E. J. Brown, Q. G. Zhang, M. Dantus, Femtosecond Transient-Grating Techniques: Population and Coherence Dynamics Involving Ground and Excited States [Review], *Journal of Chemical Physics* 110 (1999) 5772-5788.
- [83] C. Kittel, *Einführung in die Festkörperphysik*, München, Wien 1989.
- [84] S. Backus, C. G. Durfee, M. M. Murnane, H. C. Kapteyn, High Power Ultrafast Lasers, *Review of Scientific Instruments* 69 (1998) 1207-1223.
- [85] S. Backus, J. Peatross, C. P. Huang, M. M. Murnane, H. C. Kapteyn, Ti:Sapphire Amplifier Producing Millijoule-Level, 21-fs Pulses at 1kHz, *Optics Letters* 20 (1995) 2000-2002.
- [86] P. Maine, D. Strickland, P. Bado, M. Pessot, G. Mourou, Generation of Ultrahigh Peak Power Pulses by Chirped Pulse Amplification, *IEEE Journal of Quantum Electronics* 24 (1988) 398-403.
- [87] G. A. Mourou, C. P. J. Barty, M. D. Perry, Ultrahigh-Intensity Lasers: Physics of the Extreme on a Tabletop, *Physics Today* 51 (1998) 22-28.
- [88] J. Zhou, C.-P. Huang, M. M. Murnane, H. C. Kapteyn, Amplification of 26-fs, 2-TW Pulses near the Gain-Narrowing Limit in Ti:Sapphire, *Optics Letters* 20 (1995) 64-66.
- [89] G. Lenz, K. Tamura, H. A. Haus, E. P. Ippen, All-Solid-State Femtosecond Source at 1.55 μm , *Optics Letters* 20 (1995) 1289-1291.
- [90] L. E. Neslon, D. J. Jones, K. Tamura, H. A. Haus, E. P. Ippen, Ultrashort-Pulse Fiber Ring Lasers, *Applied Physics B-Lasers & Optics* 65 (1997) 277-294.
- [91] K. Tamura, E. P. Ippen, H. A. Haus, Pulse Dynamics in Stretched-Pulse Fiber Lasers, *Applied Physics Letters* 67 (1995) 158-160.

- [92] Z. Bor, B. Racz, Group Velocity Dispersion in Prisms and its Application to Pulse Compression and Travelling-Wave Excitation, *Optics Communications* 54 (1985) 165-170.
- [93] R. L. Fork, O. E. Martinez, J. P. Gordon, Negative Dispersion Using Pairs of Prisms, *Optics Letters* 9 (1984) 150-152.
- [94] E. B. Treacy, Optical Pulse Compression with Diffraction Gratings, *IEEE Journal of Quantum Electronics* QE-5 (1969) 454-458.
- [95] G. Cerullo, M. Nisoli, S. Stagira, S. Desilvestri, Sub-8-Fs Pulses From an Ultrabroadband Optical Parametric Amplifier in the Visible, *Optics Letters* 23 (1998) 1283-1285.
- [96] G. Cerullo, M. Nisoli, S. Desilvestri, Generation of 11 Fs Pulses Tunable Across the Visible by Optical Parametric Amplification, *Applied Physics Letters* 71 (1997) 3616-3618.
- [97] J. Ringling, O. Kittelmann, F. Noack, G. Korn, J. Squier, Tunable Femtosecond Pulses in the near Vacuum Ultraviolet Generated by Frequency Conversion of Amplified Ti:Sapphire Laser Pulses, *Optics Letters* 18 (1993) 2035-2037.
- [98] A. Shirakawa, I. Sakane, T. Kobayashi, Pulse-Front-Matched Optical Parametric Amplification for Sub-10-Fs Pulse Generation Tunable in the Visible and Near Infrared, *Optics Letters* 23 (1998) 1292-1294.
- [99] A. Shirakawa, I. Sakane, M. Takasaka, T. Kobayashi, Sub-5-fs Visible Pulse Generation by Pulse-Front-Matched Noncollinear Optical Parametric Amplification, *Applied Physics Letters* 74 (1999) 2268-2270.
- [100] T. Kobayashi, A. Shirakawa, Tunable Visible and Near-Infrared Pulse Generator in a 5 fs Regime, *Applied Physics B-Lasers & Optics* 70 (2000) 239-246.
- [101] W. Demtröder, *Laserspektroskopie*, Springer, Berlin 1991.
- [102] Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, New York 1984.
- [103] A. Andreoni, M. Bondani, Group-Velocity Control in the Mixing of Three Noncollinear Phase-Matched Waves, *Applied Optics* 37 (1998) 2414-2423.
- [104] N. Boeuf, D. Branning, I. Chaperot, E. Dauler, S. Guerin, G. Jaeger, A. Muller, A. Migdall, Calculating Characteristics of Noncollinear Phase Matching in Uniaxial and Biaxial Crystals, *Optical Engineering* 39 (2000) 1016-1024.

- [105] A. Shirakawa, T. Kobayashi, Noncollinearly Phase-Matched Femtosecond Optical Parametric Amplification with a 2000 cm^{-1} Bandwidth, *Applied Physics Letters* 72 (1998) 147-149.
- [106] P. Di Trapani, A. Andreoni, C. Solcia, P. Foggi, R. Danielius, A. Dubietis, A. Piskarskas, Matching of Group Velocities in Three-Wave Parametric Interaction With Femtosecond Pulses and Application to Traveling-Wave Generators, *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 12 (1995) 2237-2244.
- [107] P. Di Trapani, A. Andreoni, G. P. Banfi, C. Solcia, R. Danielius, A. Piskarskas, P. Foggi, M. Monguzzi, C. Sozzi, Group-Velocity Self-Matching of Femtosecond Pulses in Noncollinear Parametric Generation, *Physical Review A* 51 (1995) 3164-3168.
- [108] T. Wilhelm, J. Piel, E. Riedle, Sub-20-Fs Pulses Tunable Across the Visible from a Blue-Pumped Single-Pass Noncollinear Parametric Converter, *Optics Letters* 22 (1997) 1494-1496.
- [109] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Sporlein, W. Zinth, Generation of 10 to 50 fs Pulses Tunable Through all of the Visible and the NIR, *Applied Physics B-Lasers & Optics* 71 (2000) 457-465.
- [110] J. Piel, M. Beutter, E. Riedle, 20-50-fs Pulses Tunable across the Near Infrared from a Blue-Pumped Noncollinear Parametric Amplifier, *Optics Letters* 25 (2000) 180-182.
- [111] R. R. Alfano, *The Supercontinuum Laser Source*, New York 1989.
- [112] HewlettPackard, VEE OneLab: 6.0.
- [113] D. C. Arnett, Ultrafast Coherence Studies of the First Events in Photosynthesis, Dissertation, Pennsylvania 1997 .
- [114] T. MathWorks, Matlab: 6.0.0.88.
- [115] D. E. Wolf, in L. M. Loew (Ed.): *Spectroscopic Membrane Probes*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Fla USA 1988, 193-220.
- [116] D. Axelrod, Carbocyanine Dye Orientation in Red Cell Membrane Studied by Microscopic Fluorescence Polarization, *Biophysical Journal* 26 (1979) 557-574.
- [117] D. E. Wolf, Determination of the Sidness of Carbocyanine Dye Labeling of Membranes, *Biochemistry* 24 (1985) 582-586.

- [118] E. E. Jelley, Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State, *Nature* 138 (1936) 1009-1010.
- [119] G. Scheibe, Über die Veränderlichkeit der Absorptionsspektren in Lösung und die van der Waalsschen Kräfte als ihre Ursache, *Angewandte Chemie* 50 (1937) 51.
- [120] H. Fidder, J. Terpstra, D. A. Wiersma, Dynamics of Frenkel Excitons in Disordered Molecular Aggregates, *Journal of Chemical Physics* 94 (1991) 6895-6907.
- [121] E. O. Potma, D. A. Wiersma, Exciton Superradiance in Aggregates - the Effect of Disorder, Higher Order Exciton-Phonon Coupling and Dimensionality, *Journal of Chemical Physics* 108 (1998) 4894-4903.
- [122] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and Phase Transitions of the Phosphatidylcholines [Review], *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 1376 (1998) 91-145.
- [123] T. Heimburg, Mechanical Aspects of Membrane Thermodynamics. Estimation of the Mechanical Properties of Lipid Membranes close to the Chain Melting Transition from Calorimetry, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1415 (1998) 147-162.
- [124] C. H. Spink, M. D. Yeager, G. W. Feigenson, Partitioning Behavior of Indocarbocyanine Probes between Coexisting Gel and Fluid Phases in Model Membranes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1023 (1990) 25-33.
- [125] R. D. Klausner, D. E. Wolf, Selectivity of Fluorescent Lipid Analogues of Lipid Domains, *Biochemistry* 19 (1980) 6199-6203.
- [126] M. F. Ethier, D. E. Wolf, D. L. Melchior, Calorimetric Investigation of the Phase Partitioning of the Fluorescent Carbocyanine Probes in Phosphatidylcholine Bilayers, *Biochemistry* 22 (1983) 1178-1182.
- [127] L. Bergmann, C. Schaefer, *Lehrbuch der Experimentalphysik, Optik, Vol. 3*, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1987.
- [128] R. Lipowsky, E. Sackmann, *Structur and Dynamics of Membranes: Generic and Specific Interactions, Vol. 1B*, Amsterdam 1995.
- [129] H. Sato, M. Kawasaki, K. Kasatani, K. M., Raman Spektra of Some Indo-, Thia- and Selena-carbocyanine Dyes, *Journal of Raman Spectroscopy* 19 (1988) 129-132.

- [130] K. Iwata, W. L. Weaver, T. L. Gustafson, Spontaneous Raman Spectra of the Cyanine Dye DODCI and its Six Analogues using Titanium:Sapphire Laser Excitation, *Journal of Physical Chemistry* 96 (1992) 10219-10224.
- [131] J.-P. Yang, R. H. Callender, The Resonance Raman Spectra of some Cyanine Dyes, *Journal of Raman Spectroscopy* 16 (1985) 319-321.
- [132] M. Katsumata, K. Kasatani, M. Kawasaki, H. Sato, Highly Aggregated State of the Dye with the Detergent in the Premicellar Region by Resonance Raman Spectra, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 55 (1982) 717-720.
- [133] B. S. Packard, D. E. Wolf, Fluorescence Lifetime of Carbocyanine Lipid Analogues in Phospholipid Bilayers, *Biochemistry* 24 (1985) 5176-5181.
- [134] D. Zhifei, Photophysics of Indocarbocyanine Dyes in Organic Solvents, *Journal of the Chinese Chemical Society* 45 (1998) 237-240.
- [135] S. A. Passino, Y. Nagasawa, T. Joo, G. R. Fleming, Three-Pulse Echo Peak Shift Studies of Polar Solvation Dynamics, *Journal of Physical Chemistry* 101 (1997) 725-731.
- [136] S. A. Passino, Y. Nagasawa, G. R. Fleming, Three Pulse Stimulated Photon Echo Experiments as a Probe of Polar Solvation Dynamics - Utility of Harmonic Bath Models, *Journal of Chemical Physics* 107 (1997) 6094-6108.
- [137] C. J. Bardeen, S. J. Rosenthal, C. V. Shank, Ultrafast Solvation Processes in Polar Liquids Probed with Large Organic Molecules, *Journal of Physical Chemistry* 103 (1999) 10506-10516.
- [138] D. Pant, N. E. Levinger, Polar Solvation Dynamics of H₂O and D₂O at the Surface of Zirconia Nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B* 103 (1999) 7846-7852.
- [139] M. Maroncelli, The Dynamics of Solvation in Polar Liquids, *Journal of Molecular Liquids* 57 (1993) 1-37.
- [140] E. W. J. Castner, G. R. Fleming, B. Bagchi, M. Maroncelli, The Dynamics of Polar Solvation: Inhomogeneous Dielectric Continuum Models, *Journal of Chemical Physics* 89 (1988) 3519-3534.
- [141] H. Bürsing, D. Ou, S. Kundu, P. Vöhringer, Probing Solvation Dynamics in Liquid Water and at Phospholipid/Water Interfaces with Femtosecond Photon-Echo Spectroscopies, *Physical Chemistry Chemical Physics* 3 (2001) 2378-2387.

- [142] G. S. Beddard, T. Doust, G. Porter, Picosecond Fluorescence Depolarisation Measured by Frequency Conversion, *Chemical Physics* 61 (1981) 17-23.
- [143] C. V. Shank, E. P. Ippen, Anisotropic Absorption Saturation with Picosecond Pulses, *Applied Physics Letters* 26 (1975) 62-63.
- [144] P. R. Mason, J. B. Hasted, L. Moore, The Use of Statistical Theory in Fitting Equations to Dielectric Dispersion Data, *Advances in Molecular Relaxation Processes* 6 (1974) 217-232.
- [145] E. Lang, H.-D. Lüdemann, Pressure and Temperature Dependence of the Longitudinal Proton Relaxation Times in Supercooled Water to -87°C and 2500 bar, *Journal of Chemical Physics* 67 (1977) 718-720.
- [146] E. Lang, H.-D. Lüdemann, Pressure and Temperature Dependence of the Longitudinal Deuterium Relaxation Times in Supercooled Heavy Water to 300 MPa and 188 K, *Berichte der Bunsen Gesellschaft für Physikalische Chemie - An International Journal of Physical Chemistry* 84 (1980) 462-470.
- [147] E. W. Lang, H.-D. Lüdemann, Anomalies of Liquid Water, *Angewandte Chemie* 21 (1982) 315-388.
- [148] C. Ronne, L. Thrane, P. O. Astrand, A. Wallqvist, K. V. Mikkelsen, S. R. Keiding, Investigation of the Temperature Dependence of Dielectric Relaxation in Liquid Water by THz Reflection Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulation, *Journal of Chemical Physics* 107 (1997) 5319-5331.
- [149] C. Ronne, P. O. Astrand, S. R. Keiding, THz spectroscopy of Liquid H₂O and D₂O, *Physical Review Letters* 82 (1999) 2888-2891.
- [150] K. Winkler, J. Lindner, H. Bürsing, P. Vöhringer, Ultrafast Raman-Induced Kerr-Effect of Water: Single Molecule versus Collective Motions, *Journal of Chemical Physics* 113 (2000) 4674-4682.
- [151] P. Foggi, M. Bellini, D. P. Kien, I. Vercuque, R. Righini, Relaxation Dynamics of Water and HCl Aqueous Solutions Measured by Time-Resolved Optical Kerr Effect, *Journal of Physical Chemistry* 101 (1997) 7029-7035.
- [152] V. Mazzacurati, A. Nucara, M. A. Ricci, G. Ruocco, G. Signorelli, High-Resolution Low-Frequency Raman Spectra of Liquid H₂O and D₂O, *Journal of Chemical Physics* 93 (1990) 7767-7773.
- [153] G. E. Walrafen, Raman Spectrum of Water: Transverse and Longitudinal Acoustic Modes below 300 cm⁻¹ and Optic Modes above 300/cm, *Journal of Physical Chemistry* 94 (1990) 2237-2239.

- [154] M. J. Lang, X. J. Jordanides, X. Song, G. R. Fleming, Aqueous Solvation Dynamics Studied by Photon Echo Spectroscopy, *Journal of Chemical Physics* 110 (1999) 5884-5892.
- [155] Y. Nagasawa, S. A. Passino, T. Joo, G. R. Fleming, Temperature Dependence of Optical Dephasing in an Organic Polymer Glass (PMMA) from 300 K to 30 K, *Journal of Chemical Physics* 106 (1997) 4840-4852.
- [156] R. Jimenez, G. R. Fleming, P. V. Kumar, M. Maroncelli, Femtosecond Solvation Dynamics in Water, *Nature* 369 (1994) 471-473.
- [157] M. Maroncelli, G. R. Fleming, Comparison of Time-Resolved Fluorescence Stokes Shift Measurements to a Molecular Theory of Solvation Dynamics, *Journal of Chemical Physics* 89 (1988) 875-881.
- [158] J. S. Bader, D. Chandler, Computer Simulation of Phosphochemically Induced Electron Transfer, *Chemical Physics Letters* 157 (1989) 501-504.
- [159] X. Y. Song, D. Chandler, Dielectric Solvation Dynamics of Molecules of Arbitrary Shape and Charge Distribution, *Journal of Chemical Physics* 108 (1998) 2594-2600.
- [160] B. Zolotov, A. Gan, B. D. Fainberg, D. Huppter, Resonance Heterodyne Optical Kerr Spectroscopy of Solvation Dynamics in Water and D₂O, *Chemical Physics Letters* 265 (1997) 418-426.
- [161] H. Barkhuijsen, R. de Beer, W. M. M. J. Bovee, D. van Ormondt, Retrieval of Frequencies, Amplitude, Damping Factors, and Phases from Time-Domain Signals Using Linear Least-Squares Procedure, *Journal of Magnetic Resonance* 61 (1985) 465-481.
- [162] H. Barkhuijsen, R. de Beer, D. van Ormondt, Improved Algorithm of Noniterative Time-Domain Model Fitting to Exponentially Damped Magnetic Resonance Signals, *Journal of Magnetic Resonance* 73 (1987) 553-557.
- [163] W. Jarzeba, G. C. Walker, A. E. Johnson, M. A. Kahlow, P. F. Barbara, Femtosecond Microscopic Solvation Dynamics of Aqueous Solutions, *Journal of Physical Chemistry* 92 (1988) 7039-7041.
- [164] C. P. Hsu, X. Y. Song, R. A. Marcus, Time-Dependent Stokes Shift and Its Calculation from Solvent Dielectric Dispersion Data, *Journal of Physical Chemistry B* 101 (1997) 2546-2551.

- [165] H. L. Friedman, Fast Response of a Dielectric to the Motion of a Charge, *Journal of the Chemical Society, Faraday transactions 2* 79 (1983) 1465-1467.
- [166] D. Kivelson, H. Friedman, Longitudinal Dielectric Relaxation, *Journal of Physical Chemistry* 93 (1989) 7026-7031.
- [167] M. Maroncelli, Computer Simulations of Solvation Dynamics in Acetonitrile, *Journal of Chemical Physics* 94 (1991) 2084-2103.
- [168] M. Maroncelli, Continuum Estimates of Rotational Dielectric Friction and Polar Solvation, *Journal of Chemical Physics* 106 (1997) 1545-1555.
- [169] X. Song, R. A. Marcus, Quantum Correction for Electron Transfer Rates. Comparison of Polarizable versus Nonpolarizable Descriptions of Solvent, *Journal of Chemical Physics* 99 (1993) 7768-7773.
- [170] X. Y. Song, D. Chandler, R. A. Marcus, Gaussian Field Model of Dielectric Solvation Dynamics, *Journal of Physical Chemistry* 100 (1996) 11954-11959.
- [171] G. R. Fleming, J. M. Morris, G. W. Robinson, Direct Observation of Rotational Diffusion by Picosecond Spectroscopy, *Chemical Physics* 17 (1976) 91-100.
- [172] R. M. Lynden-Bell, I. R. McDonald, Reorientational Correlation Functions for Computer-Simulated Liquids of Tetrahedral Molecules, *Molecular Physics* 43 (1981) 1429-1440.
- [173] R. M. Lynden-Bell, I. R. McDonald, Tests of Models of Molecular Reorientation in Liquids, *Chemical Physics Letters* 89 (1982) 105-109.
- [174] R. M. Lynden-Bell, W. A. Steele, A Model for Strongly Hindered Molecular Reorientation in Liquids, *Journal of Physical Chemistry* 88 (1984) 6514-6518.
- [175] O. Conde, J. Teixeira, Hydrogen Bond Dynamics in Water Studied by Depolarized Rayleigh Scattering, *Journal de physique* 44 (1983) 525-529.
- [176] O. Conde, J. Teixeira, Depolarized Light Scattering of Heavy Water, and Hydrogen Bond Dynamics, *Molecular Physics* 53 (1984) 951-959.
- [177] K. Winkler, Ultraschneller Optischer Kerr-Effekt von Wasser und schwerem Wasser, Diplom, Göttingen 2000 .
- [178] G. Weber, F. J. Farris, Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(dimehtylamino)naphthalene, *Biochemistry* 18 (1979) 3075-3078.
- [179] P. L.-G. Chong, Effects of Hydrostatic Pressure on the Location of Prodan in Lipid Bilayers and Cellular Membranes, *Biochemistry* 27 (1988) 399-404.

- [180] P. L.-G. Chong, S. Capes, P. T. T. Wong, Effects of Hydrostatic Pressure on the Location of Prodan in Lipid Bilayers: A FT-IR Study, *Biochemistry* 28 (1989) 8358-8363.
- [181] A. Sommer, F. Paltauf, A. Hermetter, Dipolar Solvent Relaxation on a Nanosecond Time Scale in Ether Phospholipid Membranes as Determined by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry, *Biochemistry* 29 (1990) 11134-11140.
- [182] H. Rottenberg, Probing the Interactions of Alcohols with Biological Membranes with the Fluorescent Probe Prodan, *Biochemistry* 31 (1992) 9473-9481.
- [183] E. K. Krasnowska, E. Gratton, T. Parasassi, Prodan as a Membrane Surface Fluorescence Probe - Partitioning Between Water and Phospholipid Phases, *Biophysical Journal* 74 (1998) 1984-1993.
- [184] T. Parasassi, M. Di Stefano, G. Ravagnan, R. M. Rusch, E. Gratton, Quantitation of Lipid Phases in Phospholipid Vesicles by the Generalized Polarization of Laurdan Fluorescence, *Biophysical Journal* 60 (1991) 179-189.
- [185] M. Viard, J. Gallay, M. Vincent, M. Paternostre, Origin of Laurdan Sensitivity to the Vesicle-to-Micelle Transition of Phospholipid-Octylglucoside System: A Time-Resolved Fluorescence Study, *Biophysical Journal* 80 (2001) 347-359.
- [186] T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes, *Journal of Fluorescence* 8 (1998) 365-373.
- [187] L. A. Bagatolli, T. Parasassi, G. D. Fidelio, E. Gratton, A Model for the Interaction of 6-Lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with Lipid Environments: Implications for Spectral Properties, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemie* 70 (1999) 557-564.
- [188] N. Nandi, B. Bagchi, Dielectric Relaxation of Biological Water, *Journal of Physical Chemistry B* 101 (1997) 10954-10961.
- [189] W. P. de Boeij, M. S. Pshenichnikov, D. A. Wiersma, Ultrafast Solvation Dynamics Explored By Femtosecond Photon Echo Spectroscopies [Review], *Annual Review of Physical Chemistry* 49 (1998) 99-123.

DANKSAGUNG

Besonders herzlich danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Peter Vöhringer für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seiner Gruppe. Seine Begeisterung für das Projekt hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ohne seine wissenschaftliche Unterstützung wären die hier vorgestellten Ergebnisse nicht in dieser Form zustande gekommen.

Herrn Dr. Jörg Lindner danke ich besonders für die konstruktive Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen.

Herrn Dr. Santi Kundu danke ich für die Zusammenarbeit bei den Experimenten.

Herrn Dipl. Chem. Marco Seidel und Frau Dipl. Chem. Kathrin Winkler möchte ich besonders für die gute Stimmung und die hervorragende Zusammenarbeit im Labor danken. Die Diskussionen über immer neue weltbewegende Themen machten es unmöglich, den Humor zu verlieren.

Besonders danke ich den Doktoranden Nicole Hartmann, Kathrin Winkler und Marco Seidel sowie Dr. Jörg Lindner diese Arbeit Korrektur gelesen zu haben.

Herrn Eur.-Ing. Jaydev Jethwa danke ich für seine spontane Hilfe. Sein Vorrat an elektronischen Geräten scheint unerschöpflich zu sein.

Frau Eveline Heinemann und Herrn Dr. Matthias Müller danke ich für die sportliche Herausforderung in den Mittagspausen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Werkstätten, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herausheben möchte ich Herrn Wolfgang Sauermann, der innerhalb kürzester Zeit in der Lage war, optische Komponenten bereitzustellen und so das durchführen der Experimente beschleunigt hat.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Heimbürg, die mich bei der Präparation der Vesikel unterstützt hat.

Besonders danke ich meinen Eltern für die moralische und kulinarische Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Frau Diana und meiner süßen Tochter Jule dafür, dass sie mich in der Zeit des Zusammenschreibens in Liebe ertragen und mit noch mehr Liebe unterstützt haben.

LEBENS LAUF

Am 12. Juli 1972 wurde ich, Helge Bürsing, als Sohn des Finanzkaufmanns Helmut Bürsing und seiner Frau Christa Bürsing, geb. Baumeister, in Gifhorn geboren.

In den Jahren 1979 bis 1983 besuchte ich die Grundschule und anschließend bis 1985 die Orientierungsstufe in Celle. Im Sommer 1987 wechselte ich auf das Gymnasium Ernestinum.

In der Zeit von Juli 1989 bis Juni 1990 besuchte ich die High School der La Fargeville Central School im Staat New York der Vereinigten Staaten von Amerika und erzielte einen erfolgreichen Abschluss.

Meine Schulbildung setzte ich anschließend am Gymnasium Ernestinum in Celle fort, wo ich im Frühjahr 1993 das Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife erlangte.

Von Juli 1993 bis Juni 1994 leistete ich meinen Grundwehrdienst in einer Heeresfliegerstaffel in Celle ab.

Zum Wintersemester 1994/95 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität in Göttingen im Diplomstudiengang Chemie und bestand am Anfang des Wintersemesters 1996/97 die Diplomvorprüfung.

Im Frühjahr 1998 begann ich unter der Leitung von Priv. Doz. Peter Vöhringer am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen meine Diplomarbeit mit dem Titel „Femtosekundenspektroskopie zur Photodissoziation von Quecksilberdiiodid in Lösung“. Diese Arbeit schloss ich im Mai 1999 mit der Diplomprüfung ab.

Seitdem beschäftige ich mich als wissenschaftliche Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen mit der Solvatationsdynamik an Lipidmembran-Wasser-Grenzschichten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in dieser Arbeit zusammengefasst.

Seit dem 8. Juli 1999 bin ich mit der Erzieherin Diana Bürsing, geb. Wentzel, verheiratet., am 24. Juli 2001 wurde unsere Tochter Jule geboren.