

Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz
im Femtosekunden-Zeitfenster
als neues Meßverfahren für die konfokale Mikroskopie

Von der Fakultät für
Mathematik und Naturwissenschaften
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades und Titels eines

Doctor rerum naturalium
(*Dr. rer. nat.*)

angenommene Dissertation

von
Herrn Dipl.-Phys. Stefan Bleil
geboren am 23. Februar 1971
in Braunschweig

Gutachter: Prof. Dr. Karlheinz Maier
Zweitgutachter: apl. Prof. Dr. Wilfried Tuszynski

Tag der Disputation: 16. Dezember 2005

Meinen Eltern

In Gedenken an meinen lieben Vater
† 3. November 2005

Abstract

This thesis presents a new confocal system with high spatial resolution for fluorescence lifetime spectroscopy in the femtosecond time-scale. A Titan:Saphir-laser stimulates the two-photon absorption of the samples. The luminescence-intensity is directly determined in a three-dimensional raster-microscopic system with very high temporal and very exact local resolution. The confocal arrangement of the system allows to measure ultrafast dynamics and excited states relaxations of solutions and microscopically structured samples. Transient fluorescence spectroscopy is feasible by less modifications of the system. By using the therapeutic window from 600 nm to 900 nm the two-photon excitation makes it possible to detect luminescence in different layers of a sample. The measuring procedure is based on the Up-Conversion technique. This procedure is extended by a method derived from the inverted time-correlated single photon counting. Actual noise reduction allows to analyse very low fluorescence intensity signals. Results are presented for well-chosen dyes in different solutions, crystallized forms and as adsorbates at TiO₂-nano-particles. Extensive investigations of malachite green and other triphenylmethan dyes demonstrate the efficiency of the equipment. It is necessary to determine an independent apparatus function for detailed signal characterisation. In addition different ways are pointed out and the development of deconvolution algorithms are shown.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues konfokales Meßverfahren zur orts aufgelösten Fluoreszenzlebensdauer-Messung im Femtosekunden-Zeitfenster vorgestellt. Proben werden mit Hilfe eines Titan:Saphir-Lasers durch Zwei-Photonen-Absorption angeregt. Die Lumineszenzintensität wird direkt in einem dreidimensionalen rastermikroskopischen System mit sehr hoher zeitlicher und sehr genauer Ortsauflösung bestimmt. Durch die Konfokalität des Meßplatzes lassen sich ultraschnelle Dynamiken und Relaxationen angeregter Zustände an gelösten und mikroskopisch strukturierten festen Proben bestimmen. Eine Modifikation des Aufbaus erlaubt zusätzlich Messungen in Transmissionsanordnung. Durch die Zwei-Photonen-Anregung sind Lumineszenzmessungen in tieferen Probenschichten im therapeutischen Fenster von 600 nm bis 900 nm möglich. Das Meßverfahren beruht auf der *Up-Conversion*-Technik, die um eine aus dem invertierten zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen abgeleitete Methode erweitert ist. Die aus der Reduktion der Rauschsignale resultierende Verbesserung der Meßempfindlichkeit ermöglicht Untersuchungen an Proben mit sehr geringer Fluoreszenzintensität. Es werden Ergebnisse von Messungen an ausgewählten Farbstoffen in verschiedenen Lösungen, kristallisierten Formen und als Adsorbate an TiO_2 -Nanopartikeln präsentiert. Umfangreiche Untersuchungen des Farbstoffs Malachitgrün und anderer Triphenylmethanfarbstoffe zeigen die Leistungsfähigkeit der Apparatur. Zur exakten Charakterisierung des Signalverlaufs ist es notwendig eine unabhängige Apparatefunktion zu bestimmen. Dazu werden verschiedene Wege aufgezeigt und Entfaltungsalgorithmen vorgestellt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Karlheinz Maier für die Bereitstellung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung meiner Arbeit. Er war mir immer ein zuverlässiger Ansprechpartner und ermutigte mich durch sein persönliches Engagement nicht nur neue Wege zu beschreiten, sondern diese auch zu Ende zu gehen.

Für die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und das Einbringen neuer Ideen während meiner Arbeit bedanke ich mich bei meinem zweiten Gutachter Professor Dr. Wilfried Tuszynski.

Dirk Otteken danke ich für seine unermüdliche Hilfe bei der Lösung nicht nur aller technischen Fragen und Probleme. In unzähligen Stunden hat er mit zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Professor Dr. Alexander Rauh danke ich für die Unterstützung bei den theoretischen Fragestellungen und Professor Dr. Klaus Hinsch für seine Teilnahme an der Prüfungskommission.

Professor Dr. Gottfried Bauer und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung und Mitarbeit bei den Messungen im Bereich der optischen Nahfeldmikroskopie.

Den Mitarbeitern des „Institut für Reine und Angewandte Chemie“, die mir bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen behilflich gewesen sind, danke ich für ihre Mitarbeit und Ausdauer. Auch meinen Ansprechpartnern und den Mitarbeitern in den optischen, elektronischen und mechanischen Werkstätten möchte ich Dank sagen, daß sie meine Ideen immer schnell und zuverlässig umgesetzt haben.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekül- und Biophysik“ bedanken, die mich in der gemeinsamen Zeit bei meiner Arbeit begleitet haben und in vielfältiger Art und Weise diese durch ihre Fähigkeiten bereichert haben: den Daniels, Norbert, Gerald, Theo, Maren, Karsten, Silke, Hanno, Lutz, Joachim, Andrea, Mark, Ilka, Frank, Stefan und Knut.

Theo, Bastian, Stefan und Anke danke ich für ihre konstruktive Kritik.

Bei Hilke möchte ich mich für ihren Ansporn bedanken, der zu einem erfolgreichen Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Für meine Eltern war die Abgabe meiner Arbeit ein Abschluß einer langen Zeit, in der sie mir nicht nur in schwierigen Situationen Kraft und Hilfe gegeben haben. Ich danke ihnen, daß sie mir dies alles ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Meßaufbau	4
2.1	Laseroszillator	5
2.2	Pulskontrolle	9
2.3	Konfokaler Meßaufbau	11
2.4	Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz	13
2.5	Verfahren des Frequenzmischens	14
2.6	Probenpräparation	17
2.7	Meßwertaufnahme	19
3	Aufbau des Mikroskops und exemplarische Messung	23
3.1	Bestimmung des lateralen Auflösungsvermögens	24
3.2	Bestimmung der Eindringtiefe	25
3.3	Intensitätsabhängige Bestimmung der Fluoreszenz	27
3.4	Lebensdauerbestimmung an exemplarischen Messungen	30
3.4.1	Bestimmung der S_1 -Lebensdauer nach Abschluß der Anregung	31
3.4.2	Entfaltung der S_1 -Meßwerte durch S_2 -Daten	33
3.4.3	Apparatefunktion aus der Rückfaltung der S_2 -Meßdaten	35
3.4.4	Biexponentielle Entfaltung	38
3.5	Beschreibung des Transmissionsaufbaus	40
3.5.1	Transmissionsmessungen an Malachitgrün	41
3.6	Meßgenauigkeit und Abschätzung der Fehler	44
4	Weitere Messungen an Malachitgrün	45
4.1	Der Farbstoff Malachitgrün	45
4.2	Malachitgrün im Lösungsmittel Ethanol	48
4.2.1	Die S_1 -Fluoreszenzmessung an Malachitgrün	48
4.2.2	Die S_2 -Fluoreszenzmessung an Malachitgrün	51
4.3	Viskositätsabhängige Messungen	52
4.4	Feste Proben	54
4.4.1	Malachitgrün an Titandioxid	54
4.4.2	Malachitgrün in kristalliner Form	55

5	Möglichkeiten zur Entfaltung kurzer Signale	58
5.1	Apparatefunktion aus der Spiegelung des Signalanstiegs	59
5.2	Autokorrelation an Luft	59
5.3	Zeit- und Wellenlängenspektrum der Autokorrelation	60
5.4	Apparatefunktion aus der Kreuzkorrelation	62
6	Untersuchung weiterer Farbstoffe	68
6.1	Triphenylmethanfarbstoffe	68
6.1.1	Rhodulin Blau 6G	70
6.1.2	Kristallviolett	75
6.1.3	Brilliantgrün	78
6.2	DASPI	83
6.3	Cumarin	86
6.4	POPOP	91
7	Zusammenfassung	93
A	Abkürzungen	106
B	Programme	107
C	Benutzte Hilfsmittel	111
D	Veröffentlichung	112

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung des <i>Up-Conversion</i> -Verfahrens (UPC)	4
2.2	Schematische Darstellung der Anordnung der Lasersysteme	6
2.3	Wellenlängenspektrum des Ti:Sa-Lasers bei 830 nm	8
2.4	Autokorrelationsspur hinter dem Auskoppelspiegel bei 830 nm	9
2.5	Autokorrelationsspur hinter der achromatischen Wellenplatte bei 830 nm	10
2.6	Schematische Darstellung des konfokalen Meßaufbaus	12
2.7	Jablonski-Diagramm für Zwei-Photonen-Absorption	13
2.8	Definition der Winkel im Mischkristall	15
2.9	Indikatrix für Brechungsindices der ordentlichen und außerordentlichen Strahlen	16
2.10	Schema der Pumpe mit Probenreservoir und Glas-Durchflußküvette vor dem Mikroskopobjektiv	17
2.11	Skizze der Glas-Durchflußküvette	18
2.12	Skizze der Edelstahl-Durchflußküvette	18
2.13	Ablaufdiagramm der Meßwertaufnahme der UPC-Messung und schema- tische Darstellung der elektronischen Auswertung	19
2.14	Zeitlicher Ablauf der elektronischen Signalauswertung mit relevanten Signalen	21
2.15	Diagramm zur Darstellung der Signalfilterung durch Amplitudenselektion	21
3.1	Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme einer in Kunststoff eingebrann- ten Spur	24
3.2	Mit optischer Nahfeldmikroskopie aufgenommener Schnitt einer in Kunst- stoff eingebrannten Spur	25
3.3	Messung der Eindringtiefe an der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün . .	26
3.4	Vereinfachtes Jablonski-Diagramm des Malachitgrün	27
3.5	Fluoreszenzintensität von Malachitgrün	29
3.6	Lebensdauerermessung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün bei 480 nm .	31
3.7	S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün nach Abschluß der Anregung aus dem S_2 -Zustand	32
3.8	S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün und die aus der Faltung einer mono- exponentiellen Funktion und den S_2 -Daten errechneten Werte	33
3.9	Meßdaten der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün und geglättete Kurve .	36

3.10	Überprüfung der gerechneten geglätteten und mit einer Exponentialfunktion gefalteten Apparatefunktion mit den gemessenen Werten aus der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün	37
3.11	Meßwerte der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün und mit biexponentiellem Ansatz errechnete Fit-Kurve	39
3.12	Aufbau der Transmissionsanordnung	40
3.13	Geglättete Apparatefunktionen der Reflexions- und Transmissionsanordnung	41
3.14	S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün in Transmissionsanordnung und zugehörige Fit-Kurve	42
3.15	S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün in Transmissionsanordnung und zugehörige Fit-Kurve	43
4.1	Strukturformel des Farbstoffs Malachitgrün	46
4.2	Oxidation von Malachitgrün durch Lichteinfluß	46
4.3	Potentialkurven-Modell der Singulettzustände des Malachitgrün unter Berücksichtigung der Drehung des nicht substituierten Phenylringes	47
4.4	Absorptionsspektrum von Malachitgrün im Lösungsmittel Ethanol	48
4.5	Messwerte der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün in Ethanol	49
4.6	Vergleich der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün in den Lösungsmitteln Wasser und Ethanol	50
4.7	Vergleich der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün in den Lösungsmitteln Wasser und Ethanol	51
4.8	S_2 -Fluoreszenzlebensdauern von Malachitgrün bei unterschiedlichen Viskositäten	53
4.9	S_1 -Fluoreszenzlebensdauern von Malachitgrün bei unterschiedlichen Viskositäten	53
4.10	Lebensdauerermessung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün, adsorbiert an das Trägermaterial Titandioxid	55
4.11	Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme der Oberfläche von kristallinem Malachitgrün	56
4.12	Messung der S_2 -Fluoreszenz an kristallinem Malachitgrün	57
4.13	Messung der S_1 -Fluoreszenz an kristallinem Malachitgrün	57
5.1	Messung der Autokorrelation an Luft in einem konfokalen Reflexionsaufbau bei einer Wellenlänge von 800 nm	60
5.2	Signalintensität der Autokorrelation bei 800 nm in der konfokalen Reflexionsanordnung über der Zeit und der Wellenlänge gemessen.	61
5.3	Kreuzkorrelation bei 830 nm	62
5.4	Ablaufdiagramm zur Entfaltung der Daten der S_2 -Malachitgrün-Messung mit Daten der Kreuzkorrelation	63
5.5	S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün und Kreuzkorrelationsdaten	64
5.6	Messwerte der Kreuzkorrelation bei 830 nm in der Reflexionsanordnung und aus dem angenommenen Signalverlauf berechnete Kurve	65
5.7	S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün und berechnete Signalverlaufdaten	66

6.1	Gemeinsames Strukturmerkmal und Chromophor der Triphenylmethanfarbstoffe und Strukturformel des Triphenylmethan-Moleküls	68
6.2	Resonanzstrukturen eines mit Auxochromen substituierten Triphenylmethanfarbstoffs	69
6.3	Strukturformel des Farbstoffs Rhodulin Blau 6G	70
6.4	Absorptionsspektrum von Rhodulin Blau 6G im Lösungsmittel Ethanol	70
6.5	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve	71
6.6	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G und aus der Entfaltung mit den S_2 -Daten berechnete Fit-Kurve	72
6.7	Abklingkurve der S_2 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G und aus der Entfaltung mit der Apparatfunktion ermittelte Fit-Kurve	73
6.8	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte	74
6.9	Strukturformel des Farbstoffs Kristallviolett	75
6.10	Absorptionsspektrum von Kristallviolett im Lösungsmittel Ethanol	76
6.11	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Kristallviolett im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve	77
6.12	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Kristallviolett und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte	77
6.13	Strukturformel des Farbstoffs Brilliantgrün	78
6.14	Absorptionsspektrum von Brilliantgrün im Lösungsmittel Ethanol	79
6.15	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Brilliantgrün im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve	80
6.16	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Brilliantgrün und aus der Entfaltung mit den S_2 -Daten berechnete Fit-Kurve	81
6.17	Abklingkurve der S_2 -Fluoreszenz von Brilliantgrün und aus der Entfaltung mit der Apparatfunktion ermittelte Fit-Kurve	81
6.18	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Brilliantgrün und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte	82
6.19	Strukturformel der Farbstoffs DASPI	83
6.20	Absorptionsspektrum von DASPI im Lösungsmittel Ethanol	83
6.21	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von DASPI im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve zu den im Zeitfenster dargestellten Meßwerten	84
6.22	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von DASPI und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte	85
6.23	Strukturformel des Farbstoffs Cumarin 152	86
6.24	Absorptionsspektrum von Cumarin 152 im Lösungsmittel Ethanol	87
6.25	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Cumarin 152 im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve	88
6.26	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Cumarin 152 und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte	89
6.27	Strukturformel des Farbstoffs Cumarin 30	89
6.28	Absorptionsspektrum von Cumarin 30 im Lösungsmittel Ethanol	90

6.29	Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Cumarin 30 im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve	90
6.30	Strukturformel des Farbstoffs POPOP	91
6.31	Absorptionsspektrum von POPOP im Lösungsmittel Ethanol	91
6.32	Abklingkurve von POPOP im Lösungsmittel Ethanol und aus der Entfaltung mit der Apparatefunktion ermittelte Fit-Kurve	92

Tabellenverzeichnis

2.1	Sellmeier-Koeffizienten für BBO Kristall	15
4.1	Vergleich der Wärmeleitfähigkeit und Wärmekapazität von Wasser und Ethanol	49
4.2	Vergleich der Lebensdauern der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün für die Lösungsmittel Wasser und Ethanol	50
4.3	Vergleich der Dichte, des Brechungsindex und der Viskosität für Wasser und Ethanol	51
4.4	Vergleich der Lebensdauern der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün für die Lösungsmittel Wasser und Ethanol	52
6.1	Vergleich der aus den Messungen der S_2 - und S_1 -Daten für Rhodulin Blau 6G durch verschiedene Methoden gewonnenen Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauern	73
6.2	Vergleich der aus den Messungen der S_2 - und S_1 -Daten für Brilliantgrün durch verschiedene Methoden gewonnenen Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauern	79

Kapitel 1

Einleitung

Seit der grundlegenden Arbeit von Denk et al. [29] zur Zwei-Photonen-angeregten Raster-Fluoreszenz-Mikroskopie hat sich mit leistungsstarken Femtosekundenlasern ein neues und in den Bereichen der Biophysik, Biologie, Biotechnologie, Medizin und den Materialwissenschaften bedeutungsvolles und vielversprechendes Meßverfahren entwickelt. Bei der Zwei-Photonen-Anregung handelt es sich um einen nichtlinearen Absorptionsprozeß, der erstmals im Jahr 1931 von Maria Göppert-Mayer im Rahmen ihrer Dissertation [40] postuliert wurde. Mit diesen erweiterten Mikroskopier-Verfahren lassen sich orts aufgelöste Lumineszenzmessungen in drei Dimensionen durchführen und räumliche Abbildungen von Proben erstellen. Aktuelle Anwendungen im Bereich der Lebenswissenschaften sind in einer Spezialausgabe der Zeitschrift *microscopy research and technique* [30] beschrieben.

Durch die zeitaufgelöste Bestimmung der Lumineszenz lassen sich zusätzliche Informationen der Probe gewinnen. Die dabei ermittelte Meßgröße „Lebensdauer der Lumineszenz“ ermöglicht eine differenziertere Charakterisierung der Probenstruktur und liefert als intensiver Parameter meßtechnisch sehr große Vorteile gegenüber der Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität, bei der aufwendige und komplizierte Korrekturen erforderlich sind.

Für Ein-Photon-angeregte Lebensdauerermessungen hat sich in den letzten Jahren die *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) [10, 50, 47, 18, 24] als Verfahren zur orts aufgelösten Detektion etabliert. Mit ihr lassen sich in einem zweidimensionalen Raster zeitaufgelöste Messungen im Bereich von Nano- bis Pikosekunden durchführen. Eine erste Weiterentwicklung zur dreidimensionalen FLIM mittels Zwei-Photonen-Anregung wurde von Chen et al. [27] vorgestellt. Die Zeitauflösung blieb im Vergleich zu Ein-Photon-angeregten Untersuchungen unverändert.

Eine wünschenswerte Weiterentwicklung liegt in der Kombination von dreidimensionaler konfokaler Mikroskopie mit einer Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern bis in das Femtosekunden-Zeitfenster. Auch im Bereich der Materialwissenschaften fordern aktuelle Fragestellungen eine sehr gute zeitliche Auflösung bis hin zu einigen Femtosekunden zur Untersuchung komplexer photophysikalischer Eigenschaften und Reaktionsmechanismen. Bereits im Jahr 1999 wurde der Stellenwert zeitaufgelöster Messungen im Femtosekunden Zeitfenster von der königlichen Schwedischen Akademie der Wis-

senschaften mit der Vergabe des Nobelpreises in Chemie an Ahmed H. Zewail [115] unterstrichen. Mit Hilfe der Femtosekundenspektroskopie untersuchte er durch *pump-and-probe*-Messungen den Übergangszustand von Molekülen in der Gasphase während chemischer Reaktionen. Dem gegenüber steht im Bereich der Materialwissenschaften die Entwicklung der zeitaufgelösten Zwei-Photonen-Spektroskopie noch am Anfang, da die erforderliche hohe Anregungsintensität schnell zu photochemischen Veränderungen der Proben führt [76, 37, 38].

Im Folgenden wird die Entwicklung, Erprobung und Optimierung eines konfokalen Fluoreszenzmeßplatzes vorgestellt, der erstmals die Messung von Lebensdauern nach Zwei-Photonen-Anregung im Femtosekunden-Zeitfenster sowohl an festen als auch an flüssigen Proben ermöglicht. Diese Zeitauflösung läßt sich nur mit experimentellen Techniken realisieren, die Laserpulse als optische Schalter nutzen, da bisher keine Detektoren existieren, um ultrakurze Signale erfassen zu können. Im Gegensatz zu *pump-and-probe*-Messungen [39, 21], bei denen die Absorption der zuvor mit einem *pump*-Puls angeregten Probe nach definierter Zeit abgefragt wird, kann bei Verwendung des *Up-Conversion*-Verfahrens (UPC) die Fluoreszenz in ihrem zeitlichen Verlauf direkt gemessen werden. Das der UPC-Technik zu Grunde liegende Anrege-/Abtastverfahren [35, 112, 101, 20, 99, 106, 97], bei der ein nichtlinearer Kristall die Funktion eines optischen Schalters übernimmt, wird in dieser Arbeit eingesetzt, um die hohe Zeitauflösung zu erreichen. Die für *pump-and-probe* Versuche geltenden Einschränkungen, daß Messungen in Transmissionsanordnung [91] stattfinden, existieren für das UPC-Verfahren nicht.

Der in der Arbeit beschriebene Meßplatz gliedert sich in drei Teilbereiche: den Laser, den optischen Aufbau und das Detektionssystem. Das Lasersystem zur Generierung der Infrarot-Pulse (etwa 800 nm) ist eine spezielle Kombination aus einem Neodym-Pump- und einem Titan:Saphir-Pulslaser. Der zur Verfügung stehende Wellenlängenbereich ist für die Untersuchung der meisten biologisch und medizinisch relevanten Proben, die eine geringe Absorption im therapeutischen Fenster von 600 nm bis 900 nm besitzen, geeignet. In der Fluoreszenzspektroskopie werden derartige Laseroszillatoren häufig im Bereich grundlegender Untersuchungen an Molekülen und molekularen Systemen [116, 64, 63] eingesetzt, da sie Femtosekunden-Pulse mit hoher Leistung liefern. Diese sind insbesondere dann notwendig, wenn eine Zwei-Photonen-Anregung der Probe erfolgen soll. Bei einer Abbildung der Pulse auf oder in eine Probe wird nur im Fokus die erforderliche Photonendichte erreicht, um eine signifikante Zwei-Photonen-Anregung zu bewirken.

Das der UPC-Technik zu Grunde liegende Mischen des Fluoreszenz- und des Abtastsignals wird durch eine ausgeklügelte Strahlführung im optischen Aufbau realisiert. Mittels eines Strahlteilers wird das Laserlicht in den Anteil zur Anregung der Probe und den des Abtastsignals zerlegt. Über eine Verzögerungsstrecke wird die Laufzeit des Abtastsignals variiert. Der Anteil zur Anregung wird mit einem dichroitischen Spiegel in ein Mikroskopobjektiv reflektiert. Durch eine hohe numerische Apertur des Objektivs wird mit der Zwei-Photonen-Absorption nur ein sehr kleines Volumen der Probe angeregt und eine Ortsauflösung im Mikrometerbereich erreicht. Ohne Einsatz von Blenden oder anderen optischen Bauelementen [23, 44, 48] ist eine Lumineszenzmessung auch in

tieferen Probenschichten möglich. Das aus der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird über die konfokale Abbildung in den Mischkristall fokussiert. Das aus dem Mischprozeß resultierende Summensignal wird mit einem Photomultiplier detektiert. Durch nicht-kollineare Einstrahlung des Fluoreszenz- und Abtastsignals in den Mischkristall und großen spektralen Abstand zwischen den beiden Signalen wird eine sehr gute Filterung von Störsignalen erzielt.

Die Detektion des resultierenden Summensignals ist soweit optimiert, daß Messungen auch mit sehr geringen Anregungsintensitäten durchgeführt werden können. Dazu wird das Signal-Rausch-Verhältnis mittels der Adaption des invertierten zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens *time correlated single photon counting* (TCSPC) [95, 13, 44, 12] so stark verbessert, daß es erstmals möglich ist, Messungen auch an festen Proben vornehmen zu können. In diesem Zusammenhang wird die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungsintensität untersucht.

Die Leistungsfähigkeit des Systems wird an ausgewählten Proben mit ultrakurzen Fluoreszenzlebensdauern untersucht. Besonders geeignet sind die Farbstoffe der Triphenylmethane, die in polaren Lösungsmitteln extrem schnell abklingen und bei der Laserwellenlänge transparent sind. Anhand der Meßdaten werden Möglichkeiten zur präzisen Bestimmung der Lebensdauern vorgestellt. Dabei sind vor allem solche Verfahren von großer Bedeutung, die eine direkte Bestimmung der Lebensdauer zulassen. Die dafür notwendige Apparatefunktion wird auf unterschiedlichen Wegen gewonnen, die detailliert beschrieben werden. In dem Zusammenhang wird die Genauigkeit des Meßverfahrens untersucht und darauf aufbauend eine genaue Charakterisierung der Laserpulse beim Durchlaufen des optischen Systems vorgenommen. Die Ergebnisse belegen die Qualität der Messungen und bestätigen die hervorragenden Eigenschaften des Meßplatzes. Es werden Ergebnisse von Proben in unterschiedlichen Lösungsmitteln und in fester Form präsentiert. Verschiedene Triphenylmethan-Farbstoffe werden auf ihre strukturabhängigen Eigenschaften hin untersucht und die Ergebnisse an einem Modell interpretiert. Auf der Basis der an gelösten Proben gewonnenen Erkenntnisse werden Energietransfers von adsorbierten Farbstoffen untersucht und die Möglichkeiten von Messungen an Festkörpern aufgezeigt. Durch Betrachtung anderer Farbstoffe mit zum Teil sehr langen Fluoreszenzlebensdauern können die umfangreichen Einsatzmöglichkeiten dieses Mikroskop-Systems gezeigt werden.

Kapitel 2

Meßaufbau

Im Bereich der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen existieren bis zu einer Auflösung von einigen Pikosekunden viele Möglichkeiten, Lebensdauern zu bestimmen. Für die Messung schnellerer, sich im Femtosekunden-Fenster ändernder Signale gibt es keine Detektoren, die simultan das Zeitverhalten und die Intensität bestimmen können. In bestimmten Fällen lassen sich die Intensitäten über die Integration vieler Einzelergebnisse messen, jedoch existiert für die Bestimmung des Zeitverhaltens kein direktes Meßverfahren.

Hier bietet sich die *Up-Conversion-Technik* (UPC) [4, 5, 37, 35] an, die dem im Folgenden vorgestellten Aufbau zu Grunde liegt.

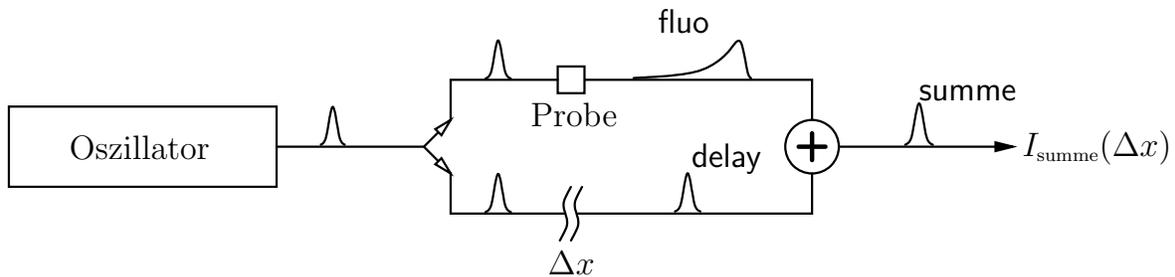


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des *Up-Conversion-Verfahrens* (UPC)

Das Meßprinzip wird durch das in Abbildung 2.1 gezeigte Schema beschrieben. Ein zu vermessendes Lumineszenzsignal (**fluo**) wird mit einem zeitlich kürzeren Signal (**delay**), dessen Verlauf bekannt ist, abgetastet. Die durch den Oszillator zur Verfügung gestellten Laserpulse werden in einem festgelegten Intensitätsverhältnis geteilt. In der einen Teilstrecke regen die Pulse das zu vermessende Objekt (**Probe**) zur Lumineszenz (**fluo**) an, in der anderen wird die Laufzeit der Laserpulse (**delay**) über die Verzögerungsstrecke (Δx) variiert. Die so zeitlich gegeneinander verschiebbaren Signale werden in einem nichtlinearen Medium (\oplus) optisch frequenzgemischt. Da die Intensität (I_{summe}) des Signals der Summenfrequenz proportional zum Lumineszenzsignal (I_{fluo}) und zum verzögerten Signal (I_{delay}) ist, steht ein lineares Nachweissystem zur Verfügung, das

folgenden mathematischen Zusammenhängen unterliegt:

$$\omega_{\text{summe}} = \omega_{\text{fluo}} + \omega_{\text{delay}} \quad (2.1)$$

$$I_{\text{summe}}(\Delta t) \sim \int_{-\infty}^{\infty} I_{\text{fluo}}(t) I_{\text{delay}}(t + \Delta t) dt \quad (2.2)$$

$$\Delta t = \frac{\Delta x}{c} \quad (2.3)$$

$c =$ Lichtgeschwindigkeit in Luft

In den folgenden Abschnitten wird der UPC-Aufbau vorgestellt. Der erste Teil befaßt sich mit dem Laseroszillator, der Pulskontrolle und dem konfokalen Meßaufbau. Weiter wird die Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz näher betrachtet und das Verfahren des Frequenzmischens erläutert. Anschließend wird die Meßwertaufnahme beschrieben, bevor ein Abschnitt über die Probenpräparation das Kapitel abschließt.

2.1 Laseroszillator

Der in Abbildung 2.1 schematisch dargestellte Oszillator besteht im Aufbau aus zwei hintereinander geschalteten Lasern: einem Nd:YVO₄-Pumplaser und einem Titan:Saphir-Laser (Ti:Sa).

Mit diesem System lassen sich Femtosekunden-Pulse im Bereich von 10⁻¹³ s bis 10⁻¹⁴ s erzeugen. Die Energie pro Puls in diesem Zeitintervall liegt bei einigen Nanojoule. Durch Fokussierung lassen sich Bestrahlungsstärken bis zu 10¹¹ $\frac{W}{cm^2}$ erzielen.

In Abbildung 2.2 wird die räumliche Anordnung der Komponenten schematisch gezeigt.

Nd:YVO₄-Pumplaser

Als Pumplaser wird ein diodengepumpter Festkörperlaser „Millenia V“ der Firma SPECTRA PHYSICS eingesetzt. Er liefert eine Leistung von 5 W im kontinuierlichen Strahlbetrieb bei einer Emissionswellenlänge von 532 nm. Die räumliche Verteilung der Moden entspricht TEM₀₀. Als Hauptbestandteile des Lasers können der Neodym-dotierte Yttrium-Orthovanadat-Kristall (Nd:YVO₄), der über zwei Diodenarrays gepumpt wird, und ein in den Resonator integrierter LBO-Kristall zur optischen Frequenzverdopplung genannt werden. Das ausgekoppelte vertikal polarisierte Laserlicht (⊙) pumpt den Kristall des Ti:Sa-Lasers. Zur Anpassung der Höhe und zur Drehung der Polarisations Ebene um 90 Grad findet die Einkopplung in den Ti:Sa-Laser-Aufbau mit Hilfe eines Spiegelturms (MT) statt.

Blende (AP_2) variieren läßt. Eine Resonatorlänge von 1,9 m führt zu einer Wiederholfrequenz von ungefähr 79 MHz. Am teildurchlässigen Spiegel (M_4) wird bis zu 500 mW nahe Infrarot-Strahlung (NIR) ausgekoppelt.

Die Aufgabe des Ti:Sa-Lasers besteht darin, kurze Pulse zu erzeugen. Durch die Kohärenz des Laser-Prozesses und die große spektrale Breite des Lasermediums oberhalb der Laserschwelle können viele Moden anschwingen. Es existiert keine feste Phasenbeziehung zwischen den Moden, da sie nicht gekoppelt sind. Erst durch das *Kerr lens modelocking* (KLM) [65, 22, 26] findet eine passive Modenkopplung statt.

Der Kerr-Effekt ist ein nichtlinearer optischer Effekt, der in Gläsern, Kristallen und Gasen auftritt, wenn sich durch Beiträge aus der nichtlinearen Polarisation der Brechungsindex des Mediums verändert. Im Ti:Sa-Laser wird der Kristall als Kerr-Medium genutzt. Der nichtlineare Anteil des Brechungsindex induziert eine transversale Variation der Brechzahl, so daß sich eine Kerr-Linse [34] ausbildet. Unter der Annahme einer radial-gaußförmigen Intensitätsverteilung läßt sich die Brennweite der Kerr-Linse wie folgt berechnen [94]:

$$f = \frac{\omega^2}{4 n_2 I_0 L} \quad (2.4)$$

Die Brennweite f hängt vom Durchmesser ω des Laserstrahls, seiner Intensität I_0 , der Länge L des Kerr-Mediums und dem nichtlinearen Brechungsindex n_2 ab.

Die Geometrie des Resonators ist so konfiguriert, daß durch die Kerr-Linse fokussierte Resonatormoden optimal mit dem Pumpvolumen überlappen, wodurch die stärker fokussierten Anteile eine größere Verstärkung erfahren. Diese Selbst-Phasen-Modulation führt zu einer konstruktiven Überlagerung der anschwingenden longitudinalen Moden. Innerhalb des Resonators propagiert ein Puls, der bei jedem Durchgang durch den Ti:Sa-Kristall in den Phasen gekoppelt wird. Die Verstärkung hängt dabei von der Besetzungsinversion und der Photonendichte ab, wobei der intensivste Puls bevorzugt verstärkt wird und die Inversion verloren geht, was den Umlauf jeweils nur eines Pulses sicherstellt. Der Resonator ist so eingerichtet, daß durch Einstellung der Blende (AP_2) Pulse einer kontinuierlichen Intensitätsverteilung bevorzugt werden.

Als Verstärkungsmedium hat sich der mit Titan dotierte Saphir-Kristall (Ti:Sa) durchgesetzt. Sowohl sein Emissions- und damit das Verstärkungsspektrum (600 nm bis 1000 nm, mit dem Maximum bei 790 nm), als auch sein Absorptionsspektrum (400 nm bis 600 nm) sind spektral recht breit und erlauben das optische Pumpen mit mehreren Moden. Durch die lange Lebensdauer der angeregten Laserniveaus läßt sich eine sehr hohe Besetzungsinversion herbeiführen. Auch die sehr guten thermischen und mechanischen Eigenschaften sprechen für den Einsatz dieses Kristalltyps, da aufgrund der hohen Zerstörschwelle große Spitzenleistungen innerhalb des Resonators möglich sind. Die im Resonator vorhandene Dispersion bewirkt ein zeitliches Auseinanderlaufen des Pulses. Dabei trennen sich die spektralen Komponenten voneinander, die blauen Anteile werden verzögert (*Chirp*). Dieser Effekt kann durch Einsetzen eines Elementes mit variabler anormaler Dispersion der Gruppengeschwindigkeit (GVD) in den Resonator ausgeglichen werden. Zur Korrektur dieses Dispersionseffektes eignet sich die gezielte Anordnung von Prismen (PR_1 , PR_2).

Zur Beurteilung der Pulsbreite wird an einem Reflex aus dem Resonator das Wellenlängenspektrum mit einem Spektrometer „PC2000“ der Firma OCEAN OPTICS [73]

kontrolliert. Das Zeitverhalten der ausgekoppelten Pulse wird meßbegleitend mit einem Autokorrelator „Micro“ der Firma APE - ANGEWANDTE PHYSIK UND ELEKTRONIK [7] untersucht. Durch Änderung der Position und Größe der Blende (AP_2) wird die Modenauswahl innerhalb des Resonators so beeinflusst, daß Pulse in verschiedenen Wellenlängenbereichen generiert werden können. Dadurch lassen sich Proben mit unterschiedlicher Absorption vermessen. Die Pulsdauer variiert leicht mit der Auswahl der Wellenlänge.

Das Bandbreite-Produkt aus der Pulsdauer und der spektralen Breite ist durch die Unschärferelation limitiert. Für die Laserpulse ergibt sich eine untere Grenze für das Pulsdauer-Bandbreite-Produkt aus folgendem mathematischen Zusammenhang:

$$t_P \Delta\lambda \geq K \frac{\lambda^2}{c} \quad (2.5)$$

Das Produkt aus den Halbwertsbreiten *Full Width Half Maximum* (FWHM) der Pulsdauer t_P und der spektralen Breite $\Delta\lambda$ ist größer beziehungsweise gleich dem mit einem Faktor K multiplizierten Quotienten aus dem Wellenlängenquadrat λ^2 und der Lichtgeschwindigkeit c . Die Konstante K ist abhängig von der Pulsform und beträgt für einen sech^2 -förmigen Puls 0,315 [31]. Als Fourierlimit wird die untere Grenze bezeichnet.

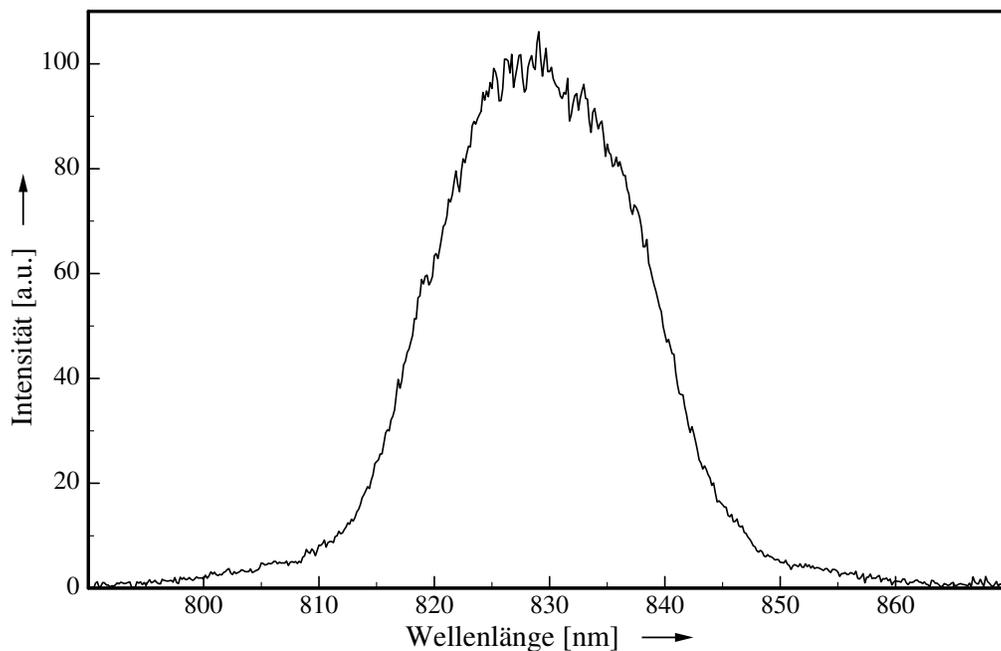


Abb. 2.3: Wellenlängenspektrum des Ti:Sa-Lasers bei 830 nm

Aus dem Wellenlängenspektrum des Ti:Sa-Lasers in Abbildung 2.3 und den Informationen zur Pulsdauer aus dem folgenden Kapitel 2.2 läßt sich ermitteln, daß das Bandbreite-Produkt der Pulse fourierlimitiert ist. Für den angenommenen sech^2 -förmigen Puls bei 830 nm liegt die spektrale Breite bei einer Pulsdauer von 35 fs um 20 nm. Eine genauere Betrachtung der Pulse erfolgt in Kapitel 5.

Achromatische Wellenplatte

Ein wichtiger Bestandteil des Lasersystems (siehe dazu Abbildung 2.2, Seite 6) ist die achromatische Wellenplatte (RO). Mit der auf den Wellenlängenbereich von 700 nm bis 1100 nm angepaßten $\frac{\lambda}{2}$ -Verzögerungsplatte der Firma CVI LASER OPTICS wird die Polarisations Ebene der NIR-Pulse um 90 Grad gedreht, so daß vertikal polarisiertes Licht (⊙) für die Einkopplung in den Versuchsteil zur Verfügung steht.

Das Drehen der Polarisations Ebene ist notwendig, da die meisten optischen Bauelemente in der gewählten Anordnung im Versuchsaufbau einen höheren Wirkungsgrad für den Betrieb mit vertikal polarisiertem Licht besitzen. So ist z.B. bei der s-polarisierten Nutzung der Umlenkspiegel die Reflektivität und die Breite des reflektierten Wellenlängenbereichs maximal.

Eine weitere Notwendigkeit, den Versuchsteil mit vertikal polarisiertem Laserlicht zu betreiben, liegt in der Wahl des Meßverfahrens. Auch für die eingesetzte Methode der UPC-Messung über eine Frequenzmischung mittels eines Kristalls und der dafür gewählten Typ-I-Phasenanpassung ist es erforderlich, daß vertikal polarisiertes Laserlicht zur Verfügung steht. In Kapitel 2.5 (Seite 14) ist eine genaue Beschreibung des Mischprozesses aufgeführt.

2.2 Pulskontrolle

Zur Kontrolle und Charakterisierung der ausgekoppelten Pulse wird ein Strahlteiler

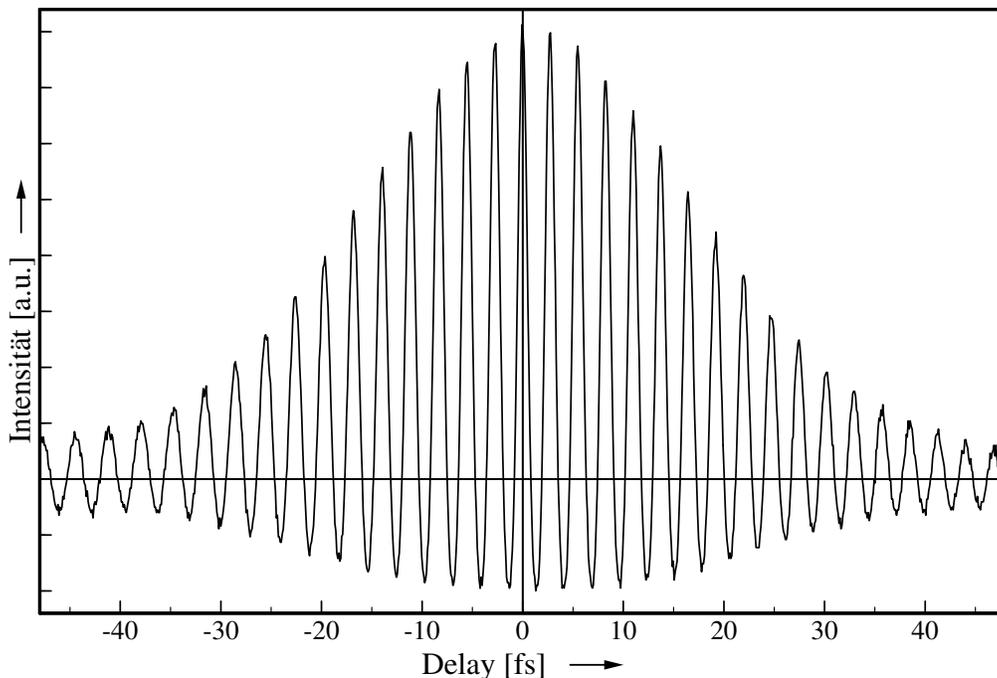


Abb. 2.4: Autokorrelationsspur, die bei einer Wellenlänge von 830 nm direkt hinter dem Auskoppelspiegel aufgenommen wurde.

so im Strahlengang hinter dem Umlenkspiegel (M_5) eingestellt (siehe Abbildung 2.2,

Seite 6), daß meßbegleitend mit einem Autokorrelator die Autokorrelationsspur beobachtet werden kann. Abbildung 2.4 zeigt eine hinter dem Auskoppelspiegel (M_4) gemessene Autokorrelationsspur, die mit dem in Kapitel 2.1 genannten Autokorrelator bei einer Laserwellenlänge von 830 nm aufgezeichnet wurde. Aus den Daten läßt sich die Pulsdauer errechnen und der zeitliche Verlauf der Pulse bestimmen. Dazu werden aus dem Laserspektrum die mittlere Periodendauer $T = \frac{\lambda}{c}$ und aus der Anzahl der Maxima in der Autokorrelationsspur die Halbwertsbreite bestimmt. Mit der Annahme, daß ein sech²-förmiger Anregungspuls vorliegt, muß das Ergebnis mit dem Faktor $\frac{1}{1,54}$ korrigiert werden [31]. Daraus errechnet sich die Pulsbreite:

$$\text{Pulsbreite} = \frac{\text{Anzahl}_{\text{Maxima}} \cdot \lambda}{1,54} \cdot \frac{1}{c} \quad (2.6)$$

Für die in Abbildung 2.4 dargestellte Autokorrelationsspur ergibt sich bei 19 relevanten Maxima eine Pulsbreite von 35 fs. Aus der symmetrischen Verteilung der Maxima um den „Nullpunkt“ kann man ableiten, daß der *Chirp* der ausgekoppelten Pulse nicht groß ist. Um die Veränderung des Zeitverhaltens der Pulse durch den Einsatz der achroma-

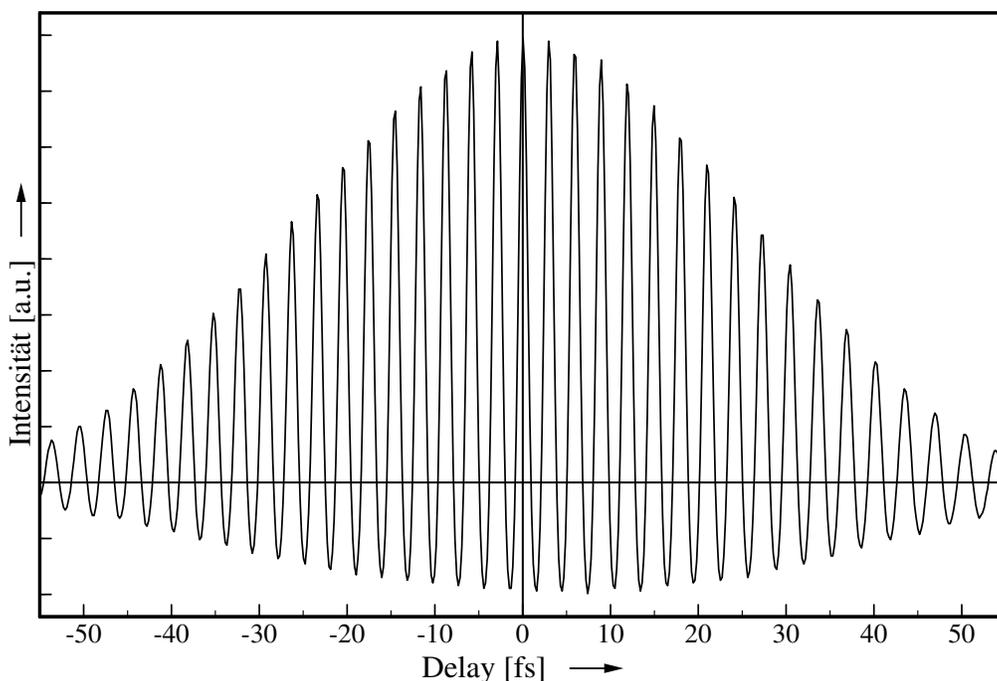


Abb. 2.5: Autokorrelationsspur, die bei einer Wellenlänge von 830 nm hinter der achromatischen Wellenplatte und dem Umlenkspiegel aufgenommen wurde.

tischen Wellenplatte zu überprüfen, ist in Abbildung 2.5 die hinter dem Umlenkspiegel (M_5) gemessene Autokorrelationsspur dargestellt. Im Vergleich zu Abbildung 2.4 nehmen die achromatische Wellenplatte und der Umlenkspiegel nur geringfügig Einfluß auf den *Chirp* der Pulse und verbreitern die Pulsdauer auf 45 fs. Eine Messung der Pulsdauern an der Probenposition und im Mischkristall läßt sich nicht direkt mit dem Autokorrelator vornehmen. In Kapitel 5 (Seite 58) werden andere Verfahren zur

Bestimmung von Pulsdauern vorgestellt.

Eine weitere Kontrolle der ausgekoppelten Pulse erfolgt über die Auswertung des Wellenlängenspektrums. Dazu wird ein Reflex über eine Glasfaser mit Hilfe eines Spektrometers ausgewertet. Das Gerät der Firma *OceanOptics* arbeitet mit einem CCD-Array und ermöglicht in situ Aufnahmen des Wellenlängenspektrums.

Durch gleichzeitiges Messen der Autokorrelation und des Wellenlängenspektrums können die ausgekoppelten Pulse kontrolliert werden. Diese permanente Überprüfung während des Meßvorgangs gewährleistet konstante Bedingungen.

2.3 Konfokaler Meßaufbau

Zur Vermessung der Proben in Reflexion steht eine Meßanordnung (Abbildung 2.6) zur Verfügung, die sich dadurch auszeichnet, daß der Brennpunkt der Anregung identisch ist mit dem Fokus der Detektion. Dieser Aufbau wird im Folgenden als konfokale Meßanordnung bezeichnet. Für das Verfahren der UPC-Messung ist eine Zerlegung des eingekoppelten Laserlichts in die Anteile zur Fluoreszenzanregung und zum Frequenzmischen notwendig. Diese Teilung erfolgt durch eine sehr dünne Strahlteilerfolie (BS_1) - einem sogenannten *Pellicle*. Als Folie wird eine $2\mu\text{m}$ starke Nitrozellulosemembran eingesetzt, deren geringe Schichtdicke ungewollte Geisterbilder und Mehrfachreflexionen fast vollständig ausschließt. Die im Versuchsaufbau montierten Strahlteiler werden über EDMUND INDUSTRIE OPTIK vertrieben. In den meisten Messungen wird eine unbeschichtete Membran verwendet, die 8% der einfallenden Strahlung reflektiert. Im Wellenlängenbereich des infraroten Lichts ist die Absorption des *Pellicles* so gering, daß die restlichen 92% der eingestrahlten Intensität transmittiert werden. Sind höhere Intensitäten für die Anregung der Proben notwendig, kann der Strahlteiler (BS_1) gegen eine Membran mit einer Reflektivität von 50% ausgetauscht werden.

Die Verzögerungs- oder auch *Delay*-Strecke besteht aus einem linearen Verschiebetisch mit zwei im 45 Grad-Winkel montierten Umlenkspiegeln (M_2 , M_3). Die Verschiebeeinheit der Firma PHYSIK INSTRUMENTE kann maximal 30 cm mit einer Auflösung von $0,2\mu\text{m}$ verfahren werden. Dies entspricht einer maximalen Verzögerung von 2 ns, die mit einer Genauigkeit von 1,3 fs eingestellt werden kann. Die Meßwertaufnahme wird über ein selbsterstelltes Programm gesteuert, das auch den Drehwinkel des Mischkristalls (CR) regelt und die Position der Probe (SA) einstellt.

Nach dem Durchlaufen der Verzögerungsstrecke wird der Puls an einem Hohlspiegel (CM) mit einem Radius von 250 mm unter einem kleinen Winkel reflektiert und in den Mischkristall (CR) fokussiert.

Mit einem Reflexionsfilter (AT) kann die Intensität des vom Strahlteiler (BS_1) zur Anregung der Fluoreszenz reflektierten Laserlichts herabgesetzt werden, bevor dieses an einem dichroitischen Spiegel (DM) reflektiert und durch ein Mikroskopobjektiv (MO) auf beziehungsweise in die Probe (SA) fokussiert wird. Nur wenn Immersionsöl zur Ankopplung der Probe (SA) verwendet wird, besitzt das Mikroskopobjektiv bei einer 100-fachen Vergrößerung eine numerische Apertur von 1,25. Das hier verwendete Öl der Firma ZEISS besitzt einen Brechungsindex von 1,518. Der daraus resultierende Öffnungswinkel der optischen Abbildung liegt bei 110 Grad und die maximal erreichbare

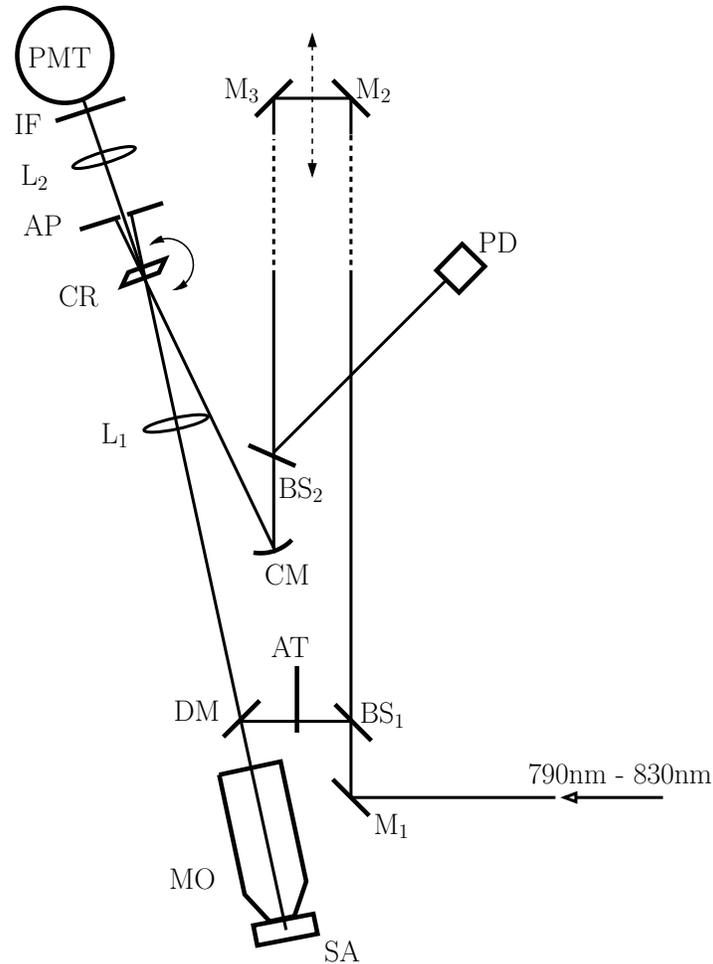


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des konfokalen Meßaufbaus. In der Graphik verwendete Bezeichnungen: AP, Blende; AT, Reflexionsfilter; BS_x , Strahlteiler; CM, Hohlspiegel; CR, BBO-Kristall; DM, Dichroitischer Spiegel; IF, Interferenzfilter; L_x , Linse; M_x , Planspiegel; MO, Mikroskopobjektiv; PD, Photodiode; PMT, Photomultiplier; SA, Probe.

Auflösung beträgt ungefähr $0,2 \mu\text{m}$.

Aufgrund der konfokalen Anordnung wird das Fluoreszenzlicht über das Mikroskopobjektiv (MO) aufgesammelt. Der dichroitische Spiegel (DM) ist als Tiefpaß-Filter so beschichtet, daß nur die infrarote Strahlung reflektiert wird. Nach dem Durchqueren des Spiegels wird mit Hilfe der Linse (L_1), die eine Brennweite von 50 mm besitzt, eine Abbildung in den Mischkristall (CR) vorgenommen. Der Prozeß der Meßwertaufnahme ist in Kapitel 2.7 beschrieben.

2.4 Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz

Die Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz entsteht durch die simultane Absorption zweier Photonen. Bereits in den dreißiger Jahren wurde von Maria Göppert-Meyer [40] prognostiziert, daß Moleküle bei hoher Photonenflußdichte simultan zwei Photonen absorbieren, um so ein höher angeregtes Energieniveau zu erreichen. Für typische optische Übergänge liegt das Zeitfenster im Bereich von Femtosekunden. Mit der Entwicklung neuer Lasersysteme haben sich Experimente mit einer elektronischen Anregung eines Moleküls durch Zwei-Photonen-Absorption in der Spektroskopie etabliert [29, 106, 100, 6, 28, 67].

Abbildung 2.7 zeigt ein vereinfachtes Jablonski-Diagramm zum Vergleich der Ein- und Zwei-Photonen-Absorption. Auf der linken Seite ist ein System mit verschiedenen elek-

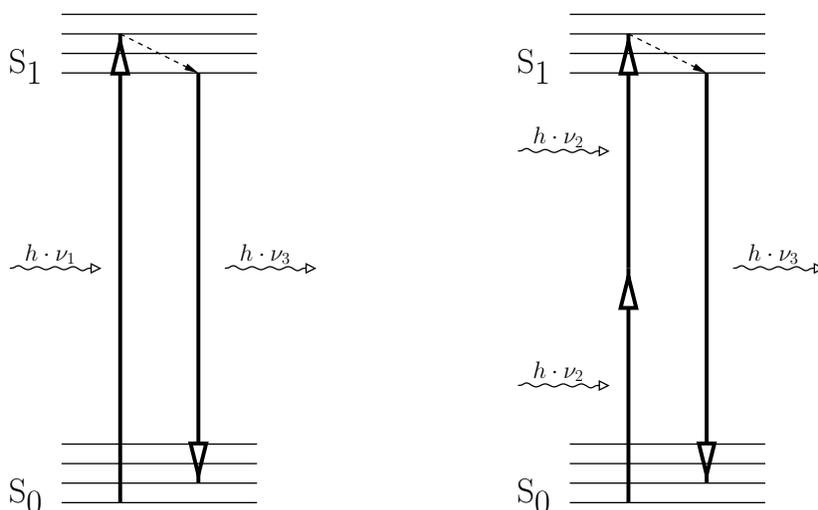


Abb. 2.7: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm mit den elektronischen und vibratorischen Energieniveaus zum Vergleich der Ein-Photonen-Absorption ($h \cdot \nu_1$) und Zwei-Photonen-Absorption ($h \cdot \nu_2$)

tronischen und vibratorischen Energieniveaus abgebildet, das ein Photon der Energie ($h \cdot \nu_1$) unter den dargestellten Resonanzbedingungen absorbiert. Dieser Vorgang entspricht der bekannten Ein-Photonen-Absorption. Die aufgenommene Energie kann durch Abgabe eines Fluoreszenzphotons ($h \cdot \nu_3$) wieder freigesetzt werden. Auf der rechten Seite der Abbildung 2.7 ist die simultane Absorption zweier Photonen dargestellt, die jeweils die halbe Energie ($h \cdot \nu_2$) besitzen. Einige Auswahlregeln für Zwei-Photonen-Übergänge hinsichtlich der beteiligten Anfangs- und Endzustände ändern sich im Vergleich zur Ein-Photonen-Absorption [25]. So gilt z.B. für die Auswahlregel des Drehimpulses eines Elektrons nicht mehr $\Delta l = \pm 1$ sondern $\Delta l = 0$ oder ± 2 . Daraus folgt, daß durch Ein- und Zwei-Photonen-Anregung unterschiedliche elektronisch angeregte Zustände erreicht werden können.

Da die Absorptionsspektren für die Zwei-Photonen-Anregung im Rahmen dieser Arbeit nicht vermessen werden können, sind jeweils nur die Ein-Photonen-Absorptionsspektren angegeben, die jedoch auch einen guten Anhaltspunkt für die Zwei-Photonen-Absorption liefern. Bisher sind nicht viele Beispiele bekannt, bei denen sich die Absorptions-

spektren gravierend unterscheiden [109, 96, 117, 107, 118]. Für die Fluoreszenzspektren ergeben sich in der Regel keine meßbaren Unterschiede, außer daß es u.a. durch die Zwei-Photonen-Anregung möglich ist, gezielt unterschiedliche vibratorische Zustände zu untersuchen [110]. Auch im Bereich der Anisotropiemessung ergeben sich dadurch neue Möglichkeiten [62].

Das aus der Ein-Photon-Absorption bekannte Lambert-Beer'sche Gesetz (2.7), bei dem die Lichtabsorption allein vom Absorptionskoeffizienten $\alpha(\lambda)$, der Schichtdicke x und der Konzentration c abhängt [89]

$$dI = -\alpha(\lambda) c I dx \quad (2.7)$$

muß für die Zwei-Photonen-Absorption durch einen weiteren Absorptionskoeffizienten $\beta(\lambda)$, wie es in Gleichung (2.8) dargestellt ist, ergänzt werden.

$$dI = -c[\alpha(\lambda) I + \beta(\lambda) I^2] dx \quad (2.8)$$

Daraus resultiert unter anderem ein anderer Wirkungsquerschnitt für die Zwei-Photonen-Absorption, der das Verhältnis zwischen einfallender I_0 und durchgelassener Intensität I beschreibt und Gegenstand aktueller Untersuchungen ist [111, 3, 2, 72, 90, 87, 113]. Wie bei der Absorption existiert auch für die Fluoreszenzintensität eine quadratische Abhängigkeit von der Anregungsintensität.

Die Anregung der Proben über die Zwei-Photonen-Absorption wurde ausgewählt, da sich sowohl bei der Meßwertaufnahme, als auch bei der Probenuntersuchung große Vorteile ergeben. Durch den großen spektralen Abstand zwischen Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge lassen sich bei der Detektion die Signale spektral eindeutig zuordnen. Gegenüber der resonanten Ein-Photon-Absorption ergibt sich ein weiterer Vorteile dadurch, daß die Fluoreszenz nur im Fokus entsteht. Außer der daraus resultierenden kleinen Anregungsvolumina gewinnt man auch die Möglichkeit, Messungen ohne störendes Fluoreszenz- oder Streulicht aus darüberliegenden Ebenen im Probeninnern durchzuführen.

Auch wenn die Zwei-Photonen-Absorption gegenüber der Ein-Photon-Absorption kein besseres Auflösungsvermögens besitzt [42], ergibt sich aus der Beschränkung der Anregung in der Fokusebene der große Vorteil, daß eine echte räumliche Selektivität besteht.

2.5 Verfahren des Frequenzmischens

Zur Frequenzmischung des Fluoreszenz- und Abtastsignals wird ein Medium mit hoher nichtlinearer Suszeptibilität benötigt. Im Aufbau ist dies ein universell einsetzbarer β -Barium-Borat-Kristall (BBO), der neben einem hohen nichtlinearen Koeffizienten auch einen großen Transmissionsbereich (190 nm bis 3500 nm) besitzt [98, 58, 88] und häufig zur Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) verwendet wird. Beim UPC-Verfahren wird das nichtlineare Medium zur Erzeugung des Summensignals genutzt. Wie in Abbildung 2.8 dargestellt ist, werden das Fluoreszenz- und das Abtastsignal unter dem Winkel $(\beta - \alpha)$ im Kristall gemischt. Im Folgenden wird dieser Prozeß speziell für den Fall des nicht-kollinearen Mischvorgangs beschrieben.

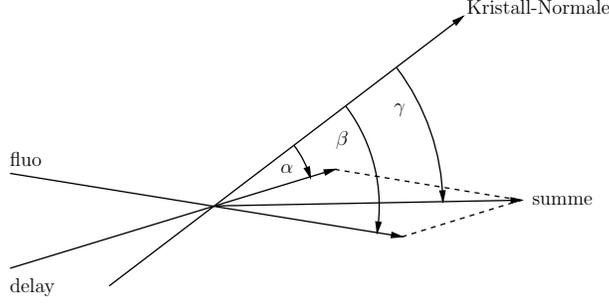


Abb. 2.8: Definition der Winkel im Mischkristall

Für die Summenfrequenz ω_{summe} gelten die in den Gleichungen (2.1) und (2.2) beschriebenen Zusammenhänge. Es ist wichtig, daß sich das Fluoreszenzsignal I_{fluor} und das Abtastsignal I_{delay} sowohl räumlich als auch zeitlich überschneiden und gleichzeitig bestimmte Bedingungen der Phasenanpassung erfüllt sind. Da für das Summensignal sowohl die Impuls- als auch die Energieerhaltung gilt, liefert die Addition der Wellenvektoren folgenden Zusammenhang:

$$\vec{k}_{\text{summe}} = \vec{k}_{\text{fluor}} + \vec{k}_{\text{delay}} \quad (2.9)$$

Eine ideale Phasenanpassung liegt genau dann vor, wenn der Betrag der Differenz $|\Delta\vec{k}| = 0$ ist. Diese Anpassung wird durch Änderung der Einfallswinkel zur Kristall-Normalen vorgenommen.

$$\Delta\vec{k} = \vec{k}_{\text{fluor}} + \vec{k}_{\text{delay}} - \vec{k}_{\text{summe}} \quad (2.10)$$

Über die „Sellmeier-Gleichung“ [32] lassen sich die wellenlängenabhängigen Brechungsindices bestimmen:

$$n_{o/e}(\lambda) = \sqrt{A + \frac{B}{(1 - \frac{C}{\lambda^2})} + \frac{D}{(1 - \frac{E}{\lambda^2})}} \quad (2.11)$$

Für den verwendeten BBO-Kristall sind die „Sellmeier-Koeffizienten“ in der Tabelle 2.1 dargestellt. Dieser gehört zum Typ der negativ uniaxialen Kristalle, bei denen die

	A	B	C	D	E
n_o	1.7018379	1.0357554	0.018003440	1.2479989	91
n_e	1.5920433	0.7816893	0.016067891	0.8403893	91

Tab. 2.1: Sellmeier-Koeffizienten für BBO Kristall

außerordentlichen Brechungsindices kleiner sind als die ordentlichen ($n_e < n_o$). Der Winkel θ zur Phasenanpassung kann nun wie folgt berechnet werden:

$$\min \left[2\pi \left(\frac{n_o(\lambda_{\text{fluor}})}{\lambda_{\text{fluor}}} + \frac{n_o(\lambda_{\text{delay}})}{\lambda_{\text{delay}}} - \frac{n_{e,o}(\lambda_{\text{summe}}, \theta)}{\lambda_{\text{summe}}} \right) \right] \longrightarrow \theta \quad (2.12)$$

Zur Veranschaulichung des Phasenanpassungswinkels θ ist in Abbildung 2.9 eine Indikatritz für die Brechungsindices n_e und n_o dargestellt. Für die zur Summenfrequenzer-

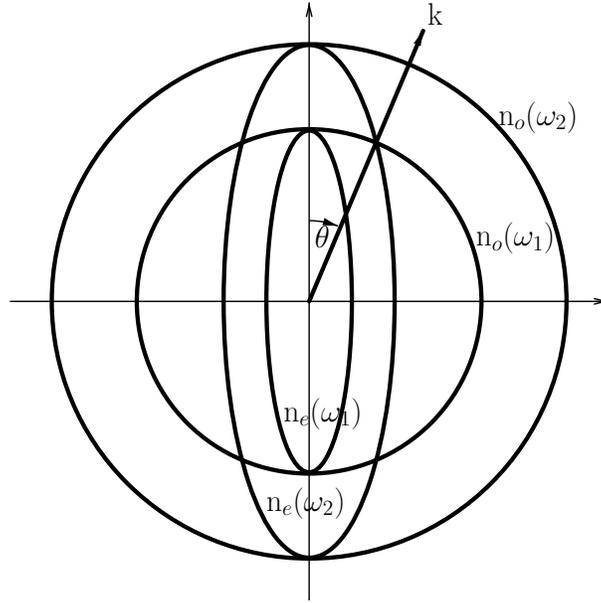


Abb. 2.9: Indikatrix für Brechungsindizes der ordentlichen (o) und außerordentlichen (e) Strahlen

zeugung genutzte Typ-I-Phasen Anpassung sind die ordentlichen Brechungsindizes winkelunabhängig, da die Polarisationsvektoren der einlaufenden Strahlen senkrecht zur optischen Achse des Kristalls stehen. Der resultierende außerordentliche Strahl hängt dagegen vom Winkel θ ab. Aus der Bestimmung des Minimums in Gleichung (2.12) läßt sich durch Einsetzen der trigonometrischen Beziehungen folgender Zusammenhang herstellen:

$$\frac{n_o(\lambda_{\text{summe}})}{\lambda_{\text{summe}} \sqrt{1 + \left(\frac{n_o^2(\lambda_{\text{summe}})}{n_e^2(\lambda_{\text{summe}})} - 1 \right) \sin^2 \theta}} = \frac{n_o(\lambda_{\text{fluo}})}{\lambda_{\text{fluo}}} + \frac{n_o(\lambda_{\text{delay}})}{\lambda_{\text{delay}}} \quad (2.13)$$

Die Lösung der Gleichung 2.13 liefert den für die Phasen Anpassung notwendigen Drehwinkel des Kristalls.

Im experimentellen Aufbau wird diese Drehung des Kristalls mit Hilfe eines elektromechanischen Tisches vorgenommen. Der Winkel zwischen Fluoreszenz- und Abtaststrahl liegt bei ungefähr 25 Grad. Der Kristall ist dafür unter einem Winkel von 33 Grad so geschnitten, daß er die Grundwellenlänge von 830 nm bei orthogonalem Auftreffen auf die Kristalloberfläche mit größtmöglicher Intensität verdoppelt. Da die Geometrie bei allen Versuchen gleich bleibt, läßt sich sehr gut eine Nullstellung des Kristalls festmachen. Entsprechend der Fluoreszenzwellenlänge muß dieser aus seiner Position herausgedreht werden. Bei einer Wellenlänge des Abtastsignals von 830 nm reichen die Drehwinkel relativ zum Schnittwinkel des Kristalls von +12 Grad für eine Fluoreszenzwellenlänge von 400 nm bis -8 Grad für 800 nm.

2.6 Probenpräparation

Für den vorgestellten Meßaufbau werden Proben in Lösung und feste Proben präpariert. Bei Proben in Lösung wird ein Volumen von ca. 100 ml vorgehalten, um einen kontinuierlichen Probenaustausch zu gewährleisten. Wie in Abbildung 2.10 dargestellt,

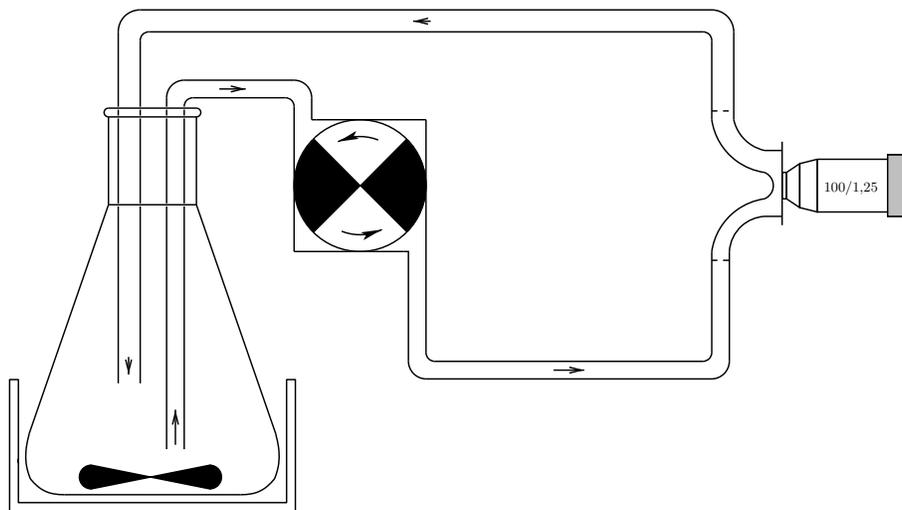


Abb. 2.10: Schema der Pumpe mit Probenreservoir und Glas-Durchflußküvette vor dem Mikroskopobjektiv

wird die Lösung in das Probenreservoir eingefüllt und mit Hilfe eines Magnetrührers in Bewegung gehalten. Das Reservoir, aus dem die Lösung in die Durchflußküvetten gepumpt wird, ist durch ein Wärme- bzw. Kältebecken temperiert.

Für Messungen an Proben in Lösung wurden zwei verschiedene Durchflußküvetten konstruiert und in der Metall- und Glaswerkstatt der Universität Oldenburg angefertigt. In Zeichnung 2.11 ist das Modell der in Abbildung 2.10 verwendeten Glas-Durchflußküvette abgebildet. Sie besteht aus einer angeschnittenen Glaskugel, die an der Unter- und Oberseite jeweils mit einem Glasrohr für den Zu- und Ablauf versehen ist. Die Querschnitte von Zu- und Ablauf sind dabei so dimensioniert, daß beim Umpumpen der Lösung kein Überdruck im Meßvolumen entsteht. Auf der Rückseite der Küvette ist zur Stativbefestigung ein Glasstab angebracht.

Die aufgeschnittene Vorderseite der Glaskugel ist mit einem Deckglas verschlossen, welches mit einer dünnen Silikonschicht auf die Schnittfläche geklebt ist. An das Deckglas wird das Mikroskopobjektiv gekoppelt. Die Abmessungen und Form dieser Küvette sind so gewählt, daß eine möglichst laminare Strömung an der Mitte des Deckglases vorliegt. Dazu wurde der hintere Teil des Volumens der Kugel mit Glas so aufgefüllt, daß eine horizontale Barriere entsteht.

Die in Abbildung 2.12 dargestellte Edelstahl-Durchflußküvette ist so konzipiert, daß die Schichtdicke genau festgelegt werden kann. Der Küvettenkörper ist aus zwei Edelstahlplatten gefertigt, deren Abstand sich mit Hilfe von flachen Abstandsscheiben aus Kunststoff variieren läßt. So kann die Küvette auf die gewünschte Schichtdicke eingestellt werden. Die beiden Außenflächen besitzen jeweils eine große Bohrung, die so ausgefräst ist, daß sie auf der Innenseiten mit einem Deckglas verschlossen werden

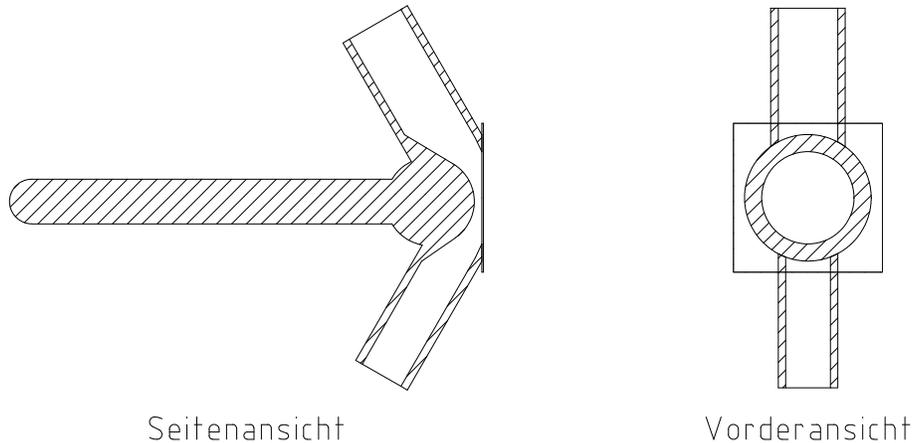


Abb. 2.11: Skizze der Glas-Durchflußküvette

kann. Dazu werden die Deckgläser mit einer dünnen Silikonschicht von innen an die Edelstahlplatten geklebt. Der Durchfluß wird über zwei Anschlüsse an einer der Edelstahlplatten hergestellt. Dabei wird über den unteren Anschluß die Probe zugeführt. Durch die spezielle Form des eingeschlossenen Küvettenvolumens herrscht im Zentrum eine annähernd laminare Strömung. Bei zu geringem Abstand der Deckgläser kann es allerdings durch Adhäsion zu störenden Effekten kommen. Über vier Schrauben werden

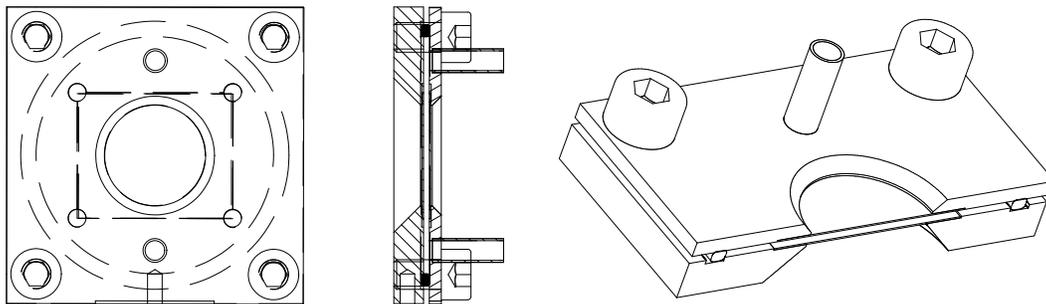


Abb. 2.12: Skizze der Edelstahl-Durchflußküvette

die beiden Seitenteile gleichmäßig auf die Abstandsscheibe gedrückt. Eine Reinigung und der Austausch der Deckglasscheiben läßt sich durch Lösen dieser Verschraubung einfach ausführen.

Die Edelstahl-Durchflußküvette hat den Vorteil, daß sich sehr genau definierte Schichtdicken der zu vermessenden Probe vorgeben lassen. Zusätzlich sind damit auch Messungen in Transmission möglich. Der Vorzug der Glas-Durchflußküvette besteht darin, daß keine Reflexionen an der hinteren Küvettenwand entstehen, da im Vergleich zur Edelstahl-Durchflußküvette keine planparallelen Flächen existieren. Weiter läßt die Glasküvette höhere Strömungsgeschwindigkeiten und damit einen schnelleren Materialaustausch zu, was besonders bei schnell ausbleichenden Proben notwendig ist. Um die größtmögliche Apertur des Mikroskopobjektivs nutzen zu können, ist es wichtig, daß die Meßobjekte mit Hilfe von Immersionsöl angekoppelt werden (siehe Kapitel 2.3). Dies gilt sowohl für die Proben in Lösung, als auch für feste Proben.

Für die Messung an letzteren gibt es entweder die Möglichkeit, die Probe direkt mit

Immersionsöl vor dem Mikroskopobjektiv zu positionieren oder diese auf der Rückseite eines Deckglases zu präparieren. Dabei muss die Stärke des Deckglases so bemessen sein, daß der Fokus möglichst in der Oberfläche der Probe liegt.

2.7 Meßwertaufnahme

Der Meßprozeß besteht in der Erfassung der Intensität des frequenzgemischten Signals in Abhängigkeit von der eingestellten Verzögerung der Abtastpulse. Im einfachsten Fall

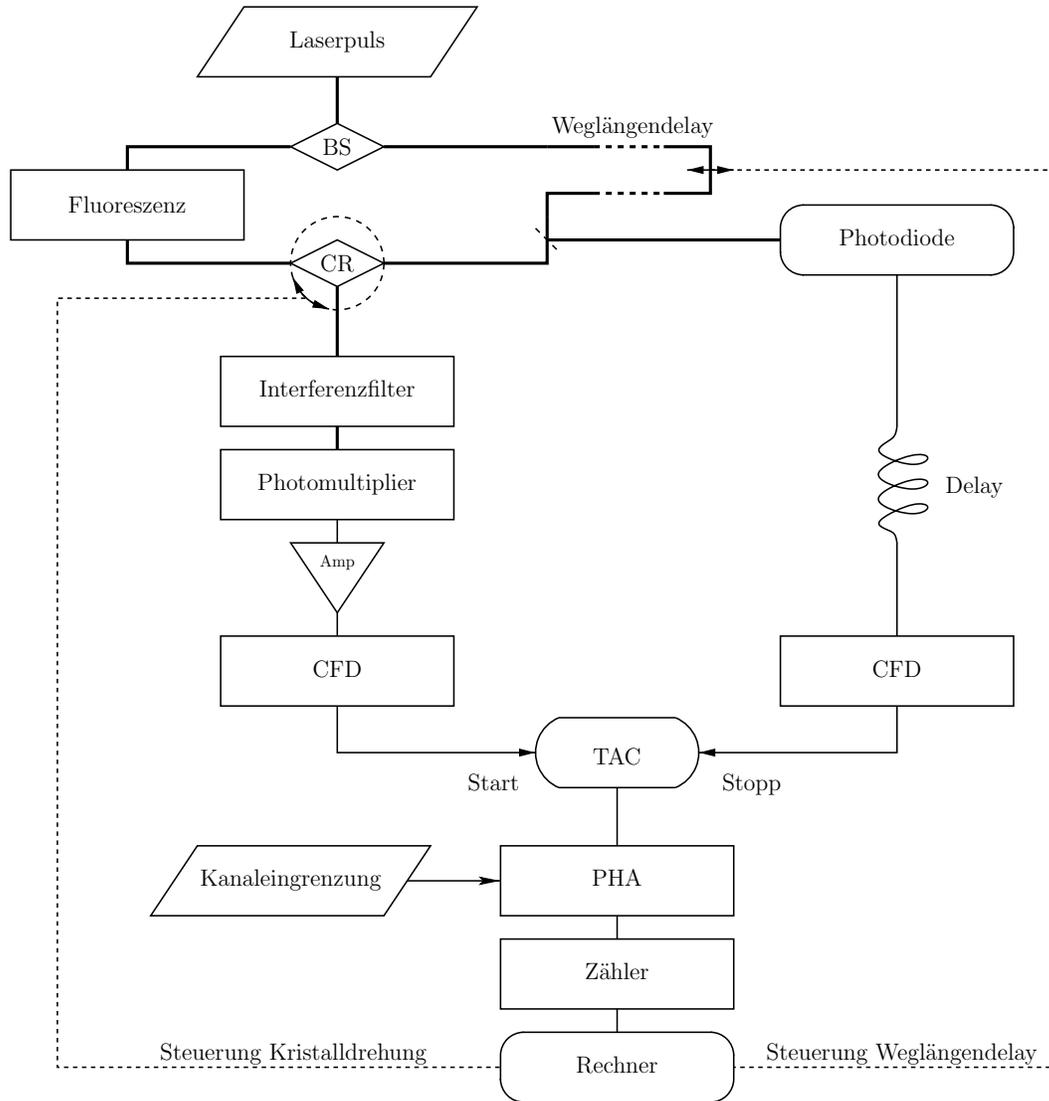


Abb. 2.13: Ablaufdiagramm der Meßwertaufnahme der UPC-Messung und schematische Darstellung der elektronischen Auswertung

reicht es aus, die Intensität in Abhängigkeit von der *Delay*position aufzuzeichnen. Da das Meßfenster nur 200 fs lang ist, ergibt sich bei einer Wiederholrate von 79 MHz ein Verhältnis von 1:63500 zwischen der Meß- und Dunkelzeit. Dafür bietet es sich an, durch

elektronisches Ausblenden der Signale in der Dunkelzeit das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Dazu wird das bei Fluoreszenzlebensdauer-Messungen im Pikosekundenbereich häufig genutzte Verfahren [53, 59, 104] des invertierten zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens auf das in dieser Arbeit vorgestellte Meßsystem adaptiert. Im Folgenden wird das daraus hervorgegangene Auswertverfahren genauer erläutert.

Die Abbildungen 2.6 (Seite 12) und 3.12 (Seite 40) zeigen die Aufbauten der Reflexions- und Transmissionsanordnung mit den für die Meßwertaufnahme notwendigen Elementen. Aus dem Mischkristall (CR) gelangen neben dem frequenzgemischten Signal auch das ungemischte Fluoreszenzlicht und der aus der *Delaystrecke* kommende Anteil in Richtung des Detektionssystems. Aufgrund der nicht-kollinearen Einstrahlung treten diese drei Anteile unter verschiedenen Winkeln aus dem Mischkristall. Durch diese geometrische Anordnung ist es möglich, die nicht benötigten Anteile durch eine Blende (AP) auszufiltern. So wird verhindert, daß Fluoreszenzlicht und aus der *Delaystrecke* kommende Anteile bzw. deren höhere Harmonische auf den Photomultiplier (PMT) abgebildet werden. Das gemischte Signal ist räumlich sehr begrenzt und nur leicht divergent, so daß sich die Blende sehr gut positionieren läßt. Über die Linse (L_2) mit einer Brennweite von 50 mm wird das Signal auf den Photomultiplier fokussiert. Zur Wellenlängenselektion und zur Unterdrückung des Streulichts ist ein Interferenzfilter (IF) direkt vor dem Eingangsfenster des Photomultipliers positioniert.

Der Ablauf des Meßprozesses ist in Diagramm 2.13 veranschaulicht und läßt sich wie folgt beschreiben: Ein Photon, das aus dem Mischprozeß der Fluoreszenz und dem verzögerten Laserpuls hervorgeht, wird über das Interferenzfilter im Photomultiplier des Typs „1P28“ der Firma HAMAMATSU detektiert. Dieser wurde wegen seiner geringen Dunkelrate speziell für das Einzelphotonenzählen ausgewählt. Um eine möglichst geringe Durchlaufzeit und eine steile Anstiegsflanke des PMT-Spannungspulses zu erhalten, sind einzelne Dynodenspannungen entsprechend angepaßt. Das Signal des Photomultipliers wird mit einem Verstärker (Amp) „Fast Preamp VT110“ der Firma ORTEC verstärkt. Danach gelangt es über einen *Constant-Fraction-Discriminator* (CFD) des Typs „Tennelec TC 453“ an den Start-Eingang des *Time-to-Amplitude-Converters* (TAC). Erreicht ein Signal aus der Photodiode (PD), die über einen Strahlteiler (BS_2) in den Strahlengang hinter der *Delaystrecke* eingekoppelt ist, den Stopp-Eingang des TACs innerhalb des eingestellten Zeitfensters von 5 ns, so gibt dieser ein entsprechendes Signal am Ausgang des TACs ab. Diese Referenzdiode vom Typ „ET-200“ der Firma ELS registriert den Laserpuls nach dem Durchlaufen der Verzögerungsstrecke und liefert ein Signal, das einen zeitlich konstanten Bezug zum Mischprozeß herstellt. So wird einem Fluoreszenzereignis genau das zugehörige Startsignal zugeordnet.

Die Zeitdifferenz zwischen Start- und Stopp-Signal steht als Spannungsamplitude am Ausgang des TACs zur Weiterverarbeitung zur Verfügung. Dieses Ausgangssignal wird mit einem Vielkanalanalysator, der im Modus eines Pulshöhenanalysators (PHA) betrieben wird, auf 1024 Kanäle aufgeteilt. Durch die Auswahl von zehn Kanälen zur Auswertung wird eine Eingrenzung auf ein Zeitfenster von etwa 50 ps erreicht. In einem vorgegebenen Zeitintervall werden die in den ausgewählten Kanälen auflaufenden Ereignisse von einem Zähler des Typs „HP 51131“ der Firma HEWLETT PACKARD registriert.

Der zeitliche Ablauf der Auswertung ist in Abbildung 2.14 veranschaulicht. In der obe-

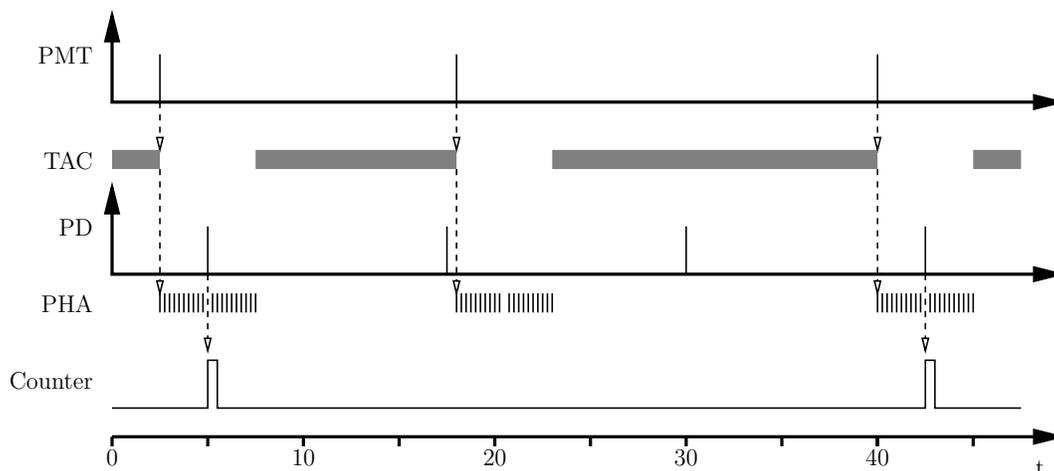


Abb. 2.14: Zeitlicher Ablauf der elektronischen Signalauswertung mit den Signalen des Photomultipliers (PMT), den Zeitfenstern des *Time-to-Amplitude-Converters* (TAC), den Signalen der Photodiode (PD), den Kanälen der Pulshöhenanalyse (PHA) und den daraus resultierenden zu zählenden Ereignissen (Counter)

ren Zeile sind Signale des Photomultipliers aufgeführt, wobei das erste und dritte Ereignis Fluoreszenzsignale darstellen, das mittlere dagegen ein unkorreliertes beschreibt. Darunter ist zu erkennen, wie das Signal des PMT das 5 ns-Zeitfenster des TACs öffnet. In der nächsten Zeile sind Signale, die der Wiederholfrequenz des Anregungslasers entsprechen, im Abstand von 12,7 ns dargestellt. Diese über die Photodiode aufgenommenen Signale werden nach einer konstanten Verzögerungszeit (elektrisches *Delay*) dem TAC als Stopp-Signal zur Verfügung gestellt. Darunter folgt die Darstellung der Zeitfenster des Vielkanalanalysators, wobei die eingezeichnete Lücke den selektierten Kanälen der PHA entspricht. Fällt ein verzögertes Signal der Photodiode in diese Lücke, wird ein Impuls an den Zähler (Counter) weitergegeben.

Die Selektion durch den Vielkanalanalysator ist in Abbildung 2.15 dargestellt. Der

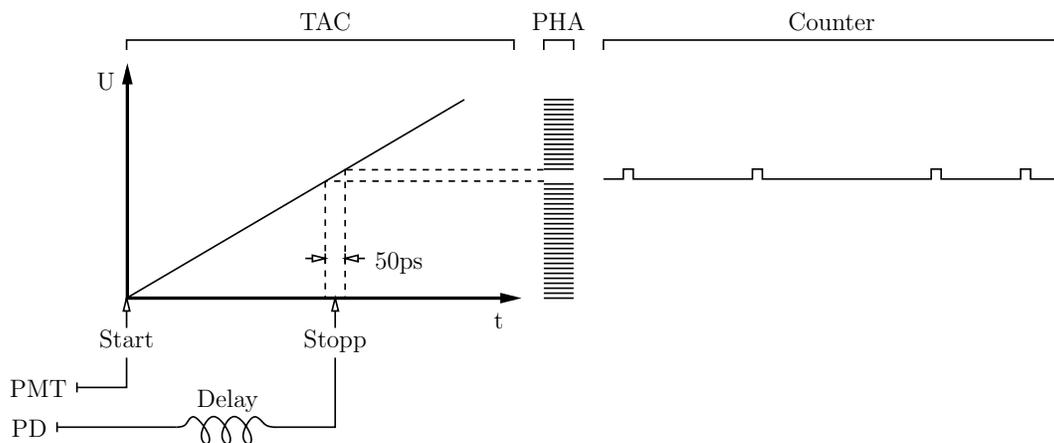


Abb. 2.15: Diagramm zur Darstellung der Signalfilterung durch Amplitudenselektion des TAC-Signals mit Hilfe ausgewählter Kanäle der Pulshöhenanalyse

TAC wird durch einen Impuls des Photomultipliers (PMT) gestartet und durch ein zeitlich konstant verzögertes Signal der Photodiode gestoppt. Die so ermittelten Spannungsamplituden werden vom Vielkanalanalysator in unterschiedlichen Kanälen registriert. Durch Selektion einiger Kanäle wird dann wie oben beschrieben das Meßfenster auf 50 ps eingeschränkt. Diese in den ausgewählten Kanälen einlaufenden Ereignisse werden als Impulse an den Zähler weitergeleitet. Durch diese geeignete elektronische Auswertung lassen sich die Signale in 99,6% der Dunkelzeit ausblenden, so daß eine signifikante Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht wird. Fallen Start- und Stopp-Signal in den Zeitbereich von 50 ps, so ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, daß das detektierte Photon mit der Photolumineszenz und dem anregenden Laserpuls korreliert ist.

Die selbst entwickelte und erstellte Meßsoftware, die auch die Zeitbasis des Zählers, die Stellung des Mischkristalls und die Positionierung der Probe steuert, liest den Zähler aus und registriert die Meßergebnisse als Zählrate in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit des Mischpulses.

Kapitel 3

Aufbau des Mikroskops und exemplarische Messung

Dieses Kapitel befaßt sich mit dem Aufbau und den Eigenschaften des optischen Systems zur Anregung und Detektion der Fluoreszenz und zeigt mit der Analyse exemplarischer Messungen die Leistungsfähigkeit des Meßaufbaus.

Das aufgebaute optische System (siehe Abbildung 2.6, Seite 12) besteht im Wesentlichen aus einem Mikroskopobjektiv (MO) des Typs „100/1,25“ der Firma HUND aus Wetzlar und einer Linse (L_1) mit einer Brennweite von 50 mm, die das reelle Bild der Probe auf den Mischkristall (CR) abbildet. Mit der großen numerischen Apertur des Objektivs von 1,25 und durch das Einbringen einer Immersionsflüssigkeit zwischen Objektiv und Meßobjekt wird eine hohe laterale Auflösung im Mikrometerbereich erreicht. Dadurch wird auch eine Änderung des Brechungsindex beim Durchlauf des optischen Anregungssystems vermieden.

In den ersten Abschnitten werden Untersuchungen zum Auflösungsvermögen, zur Eindringtiefe sowie zur Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Anregungsintensität dargestellt. Im zweiten Teil werden Messungen der bekannt ultrakurzen Fluoreszenz einer Farbstofflösung und verschiedene Ansätze zur Datenanalyse vorgestellt. Im letzten Teil des Kapitels wird über Untersuchungen in optischer Transmissionsanordnung anstelle der konfokalen Reflexionsanordnung berichtet. Des weiteren erfolgt eine Abschätzung der Genauigkeit des Meßsystems.

3.1 Bestimmung des lateralen Auflösungsvermögens

Zur Erfassung der Abbildungsgeometrie wird ein Einbrennversuch durchgeführt, der mit zwei verschiedenen mikroskopischen Methoden ausgewertet wird. Die Ergebnisse der Messungen werden im Folgenden vorgestellt.

Beim Einbrennversuch wird ein geeigneter Kunststoff vor dem Mikroskopobjektiv positioniert und durch den Anregungslaser werden entsprechende Löcher in das Material gebrannt. Während der Messung wird die Probe parallel vor dem Mikroskopobjektiv verschoben und gleichzeitig die Anregungsintensität über das Einstellen von Filtern variiert. So ist gewährleistet, daß nur soviel Energie in die Probe gelangt, bis eine Einbrennspur zu erkennen ist. Die Präparation des Kunststoffs erfolgt dabei hinter einem Deckglas, das wiederum über Immersionsöl an das Mikroskopobjektiv gekoppelt ist. Die Deckglasstärke ist dabei so gewählt, daß sich der Fokus nur wenige Mikrometer tief in der Probe befindet. Dieser Aufbau erlaubt die Vermessung der Einbrennspur. Ein

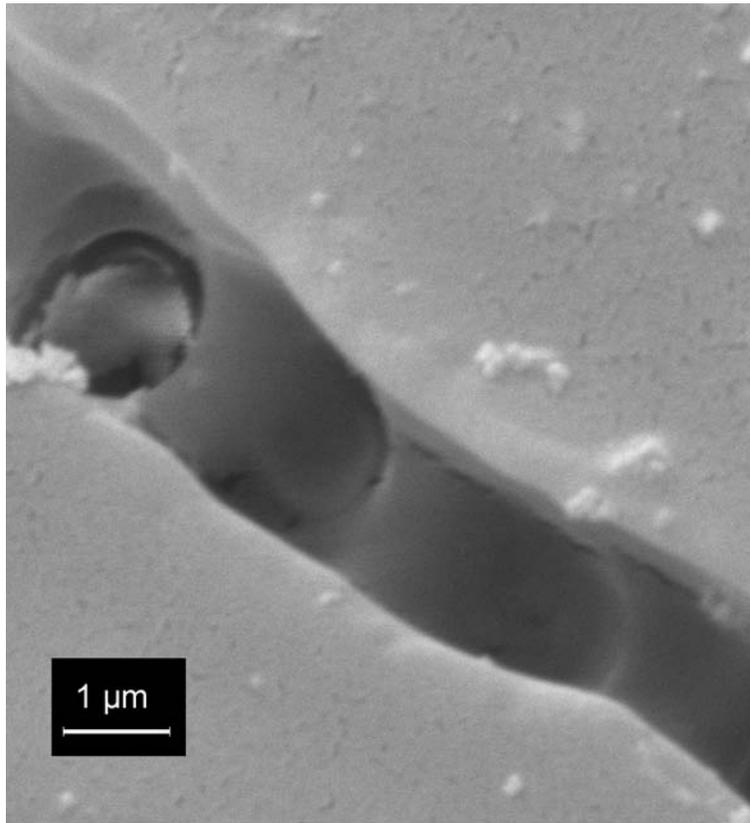


Abb. 3.1: Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme einer in Kunststoff eingebrannten Spur. Deutlich sind Teile des abgetragenen Materials als helle Partikel auf der Probenoberfläche zu erkennen.

weiterer Vorteil der Präparation hinter einem Deckglas besteht darin, daß sich aus der

Probe tretendes Material nicht auf dem Mikroskopobjektiv ablagert.

In Abbildung 3.1 ist die Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme der untersuchten Probe zu erkennen. Die Aufnahme entstand am „Institut für Reine und Angewandte Chemie“ an der Universität Oldenburg. Auf dem Bild erkennt man deutlich die Form der eingebrannten Spur. Leichte Aufwölbungen an den Spurrändern und Teile des abgetragenen Materials auf der Oberfläche zeigen, daß die Probe nur im Inneren die Energie des Anregungslasers absorbiert. Der eingebrannte Kanal ist nach oben offen, da das ablatierte Material die Probe in diese Richtung verlassen muß. Die Breite der Spur läßt sich an der Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme gut ablesen und beträgt etwa einen Mikrometer.

Um die Dimensionen genauer zu vermessen, wird an gleicher Stelle der Probe eine Aufnahme mit optischer Nahfeldmikroskopie *Scanning Near-Field Optical Microscopy* (SNOM) [33, 19] erstellt. Die in Abbildung 3.2 dargestellte Kurve zeigt das Ergebnis

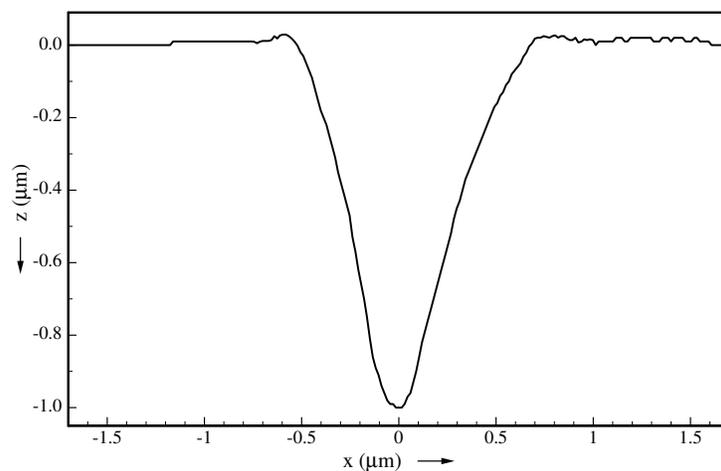


Abb. 3.2: Mit optischer Nahfeldmikroskopie aufgenommener Schnitt einer in Kunststoff eingebrannten Spur

aus Messungen, die in der Arbeitsgruppe „Strahlungswandlung und Halbleiterphysik“ an der Universität Oldenburg durchgeführt wurden. Zu sehen ist ein zum Spurverlauf transversal aufgezeichneter Schnitt der Kunststoffprobe. Die Auswertung bestätigt die Breite des Einbrennkanals und zeigt zusätzlich, daß die Tiefe ebenfalls ein Mikrometer beträgt. An den oberen Rändern des eingebrannten Kanals sind aufgrund des Materialaustritts leichte Aufwölbungen zu sehen, die ebenfalls in der Aufnahme des Rasterelektronen-Mikroskops (siehe Abbildung 3.1) zu erkennen sind.

Zwar schließt die Nahfeldmikroskopie in diesem Fall die Bestimmung der Form des eingebrannten Kanals aus, kann jedoch zur genauen Bestimmung der Tiefe genutzt werden.

3.2 Bestimmung der Eindringtiefe

Die Eindringtiefe des Laserpulses ist bei einer Zwei-Photonen-angeregten Fluoreszenzmessung wesentlich größer als bei einer Ein-Photon-Anregung. Da weder die abbildenden Optiken, noch die untersuchte Probe eine Absorption bei der Wellenlänge der NIR-

Pulse besitzen, ist nur im Fokus die Lichtintensität entsprechend hoch, daß dort durch Zwei-Photonen-Absorption Fluoreszenz induziert werden kann. Dadurch wird das Ausbleichen des nicht vermessenen Materials vermieden und es gibt nur wenig störendes Fluoreszenzlicht außerhalb der Brennebene. Zur Messung der Eindringtiefe wird die in

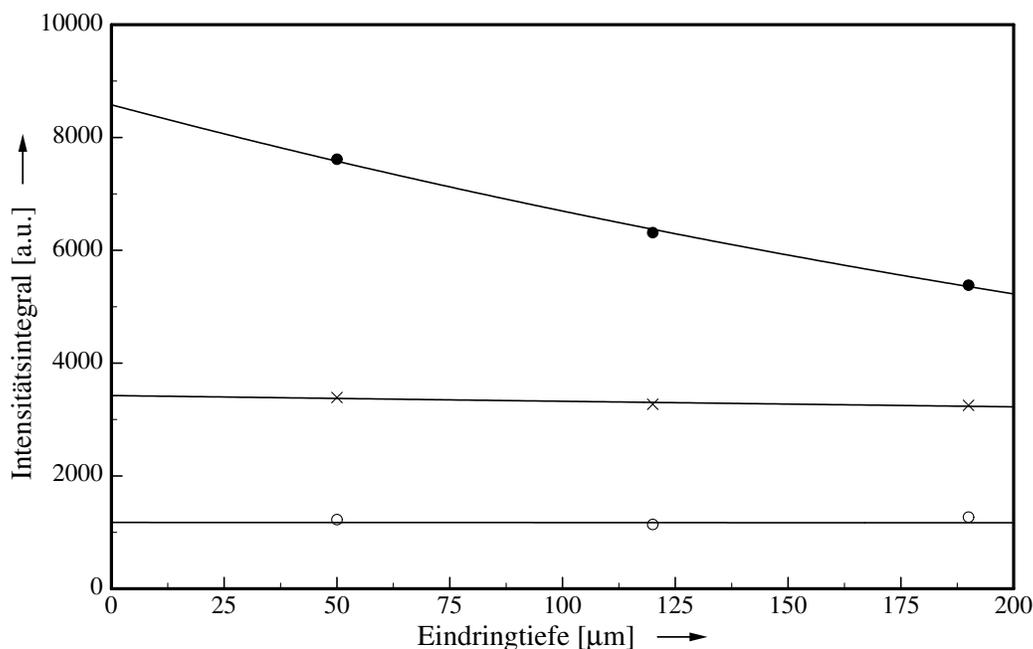


Abb. 3.3: Messung der Eindringtiefe an der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün in Wasser bei einer 10^{-2} (\bullet), 10^{-3} (\times) und 10^{-4} (\circ) molaren Konzentration

Abbildung 2.11 gezeigte Glas-Durchflußküvette mit einem Deckglas von $70 \mu\text{m}$ Stärke bestückt. Mit dem Einbringen weiterer Deckgläser gleicher Stärke zwischen Mikroskopobjektiv und Küvette läßt sich die Eindringtiefe variieren. Dadurch ist gewährleistet, daß sich der Brechungsindex im Strahlengang vor der Probe bei den Messungen nicht ändert und die Geometrie des gesamten Systems erhalten bleibt.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität in verschiedenen Tiefen der Probe werden Messungen an der S_2 -Fluoreszenz des Farbstoffs Malachitgrün im Lösungsmittel Wasser durchgeführt. Aus der Absorptionmessung in Kapitel 4.2 (siehe Abbildung 4.4) läßt sich ablesen, daß die molare Extinktion bei der S_2 -Fluoreszenzwellenlänge von Malachitgrün (480 nm) einen Wert von ungefähr $0,1 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ besitzt. Die Reabsorption in die direkte Anregung des S_1 -Zustandes ist relativ gering und läßt sich bei einer Eindringtiefe von maximal $200 \mu\text{m}$ nur für hohe Konzentrationen gut bestimmen.

In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse der Proben mit unterschiedlicher Konzentration ($10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (\bullet), $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (\times) und $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (\circ)) dargestellt. Die Intensität wird durch Integration der Daten einer Fluoreszenzlebensdauer-Messung (siehe Kapitel 3.4) über den gesamten Zeitbereich bestimmt.

Es läßt sich ablesen, daß bei der geringen Konzentration kein Unterschied für die verschiedenen Meßtiefen auftritt. Bei der Probe mit hoher Konzentration kann man dagegen deutlich den Effekt der Reabsorption erkennen.

In Abbildung 3.3 sind zu den Meßpunkten auch die Fitkurven, die nach den funktionalen Zusammenhängen des Lambert-Beer'schen-Gesetzes (3.1) berechnet wurden [89], eingezeichnet.

$$I(x) = I_0 e^{-\epsilon(\lambda) x c} \quad (3.1)$$

Aus dem Fit der Daten der 10^{-2} molaren Probe errechnet sich ein Extinktionskoeffizient von $0,21 \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Dieser liegt im Bereich des durch die Absorption ermittelten Wertes. Für die beiden niedrigeren Konzentrationen wurde für den Fit der Extinktionskoeffizient vorgegeben.

Diese Meßreihe zeigt, daß bei den in dieser Arbeit verwendeten Probenkonzentrationen keine oder nur geringe Reabsorptionseffekte zu berücksichtigen sind.

3.3 Intensitätsabhängige Bestimmung der Fluoreszenz

Um die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungsintensität zu bestimmen, werden Messungen an in Wasser gelöstem Malachitgrün durchgeführt. Zur Vermeidung von Reabsorption liegt die Probenkonzentration bei $10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Mit Hilfe des Reflexionsfilters (AT) (siehe Abbildung 2.6, Seite 12) wird die Anregungsintensität eingestellt. Dieser ist zwischen dem Strahlteiler (BS_1) und dem dichroitischen Spiegel (DM) eingebaut. In einer Eichmessung wird mit Hilfe eines thermischen Intensitätsmeßkopfes die Leistung an der Probenposition vermessen. So läßt sich die durch das

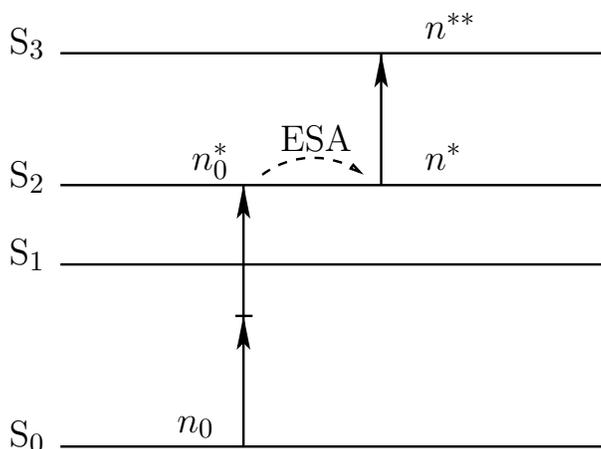


Abb. 3.4: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm für die Singulett-Zustände des Malachitgrün mit den Besetzungszahlen für die Zwei-Photonen- und *excited-state*-Absorption (ESA)

optische System entstehende Abschwächung berücksichtigen. In Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse aus den Messungen mit unterschiedlicher Anregungsintensität aufgetragen. Zur Bestimmung der Intensitätswerte sind die Integrale aus den jeweiligen Abklingkurven gewonnen worden. Es zeigt sich in den Bereichen kleiner Intensitäten, daß der erwartete quadratische Zusammenhang zwischen der Anregungsintensität und der daraus resultierenden Fluoreszenz erfüllt wird. Für höhere Anregungsleistungen gilt dieser

Zusammenhang offensichtlich nicht. Hier ist ein deutlich geringerer Anstieg zu beobachten als erwartet [110, 6, 46, 81].

Eine mögliche Erklärung ist, daß mit zunehmender Leistung die große Wahrscheinlichkeit der Drei-Photonen-Absorption zu einer stärkeren Besetzung des S_3 -Zustandes führt und dadurch der S_2 -Zustand in Konkurrenz weniger stark besetzt werden kann. Ein vermutlich sehr kleiner Wirkungsquerschnitt der Drei-Photonen-Absorption spricht allerdings gegen diese Überlegung.

Ein anderer und wesentlich wahrscheinlicherer Erklärungsansatz liegt in der Annahme einer *excited-state*-Absorption (ESA). Wie in Abbildung 3.4 schematisch gezeigt ist, kann dabei durch Absorption eines zusätzlichen Photons eine weitere Anregung aus dem S_2 -Zustand in ein höheres Niveau stattfinden. Eine solche Ein-Photon-Absorption hat vermutlich einen recht hohen Wirkungsquerschnitt und sollte dementsprechend bei hohen Anregungsintensitäten Einfluß nehmen.

Im Folgenden soll dieser Effekt abgeschätzt werden. Zur Beschreibung des Zusammenhangs werden alle Moleküle n_{ges} im Gleichgewicht betrachtet:

$$n_{ges} = n_0 + n_0^* \quad (3.2)$$

$$= n_0 + (n^* + n^{**}) \quad (3.3)$$

Die Besetzungszahlen sind, wie in Abbildung 3.4 dargestellt, definiert:

- n_0 : Besetzungszahl im Grundzustand
- n_0^* : Besetzungszahl im S_2 -Zustand
(nach Zwei-Photonen-Anregung)
- n^* : Besetzungszahl im S_2 -Zustand
(nach Zwei-Photonen-Anregung und
ESA in den S_3 -Zustand)
- n^{**} : Besetzungszahl im S_3 -Zustand
(nach ESA)

Da die Absorptionsquerschnitte für die Ein- und Zwei-Photonen-Absorption nicht identisch sind, werden zusätzlich folgende Parameter definiert:

β : Absorptionsquerschnitt der Zwei-Photonen-Absorption von S_0 nach S_2

γ : Absorptionsquerschnitt der Ein-Photon-Absorption von S_2 nach S_3

In die Berechnung der Besetzungszahl des S_2 -Zustandes nach erfolgter Zwei-Photonen-Anregung geht die Anregungsintensität quadratisch ein.

$$n_0^* = n_0 \cdot \beta \cdot I^2 \quad (3.4)$$

$$= (n_{ges} - n_0) \cdot \beta \cdot I^2 \quad (3.5)$$

$$= n_{ges} \cdot \frac{\beta \cdot I^2}{1 + \beta \cdot I^2} \quad (3.6)$$

3.3. INTENSITÄTSABHÄNGIGE BESTIMMUNG DER FLUORESZENZ

Durch die Ein-Photon-Absorption aus dem S_2 -Zustand ergibt sich für die Besetzungszahl des S_3 -Zustandes folgender Zusammenhang:

$$n^{**} = n_0^* \cdot \gamma \cdot I \quad (3.7)$$

$$= (n^* + n^{**}) \cdot \gamma \cdot I \quad (3.8)$$

$$= n^* \cdot \frac{\gamma \cdot I}{1 - \gamma \cdot I} \quad (3.9)$$

Nach erfolgter ESA durch eine Ein-Photon-Absorption hängt die Besetzungszahl des S_2 -Zustandes linear von der Anregungsintensität ab.

$$n^* = n_0^* - n^{**} \quad (3.10)$$

$$= n_{ges} \cdot \frac{\beta \cdot I^2}{1 + \beta \cdot I^2} - n^* \cdot \frac{\gamma \cdot I}{1 - \gamma \cdot I} \quad (3.11)$$

$$= n_{ges} \cdot \frac{\beta \cdot I^2}{1 + \beta \cdot I^2} \cdot (1 - \gamma \cdot I) \quad (3.12)$$

Die in Gleichung (3.12) unter der Annahme der ESA errechnete Abhängigkeit der Fluoreszenz aus dem S_2 -Zustand (proportional zu n^*) von der Anregungsintensität wird mit Hilfe einer Meßreihe überprüft.

Die durch Integration über das Zeitfenster der jeweiligen Lebensdauerermessung ermittelten Werte der Fluoreszenzintensität sind neben dem Fit mit den freien Parametern n_{ges} , β und γ in Abbildung 3.5 über der Anregungsleistung dargestellt. Offensichtlich

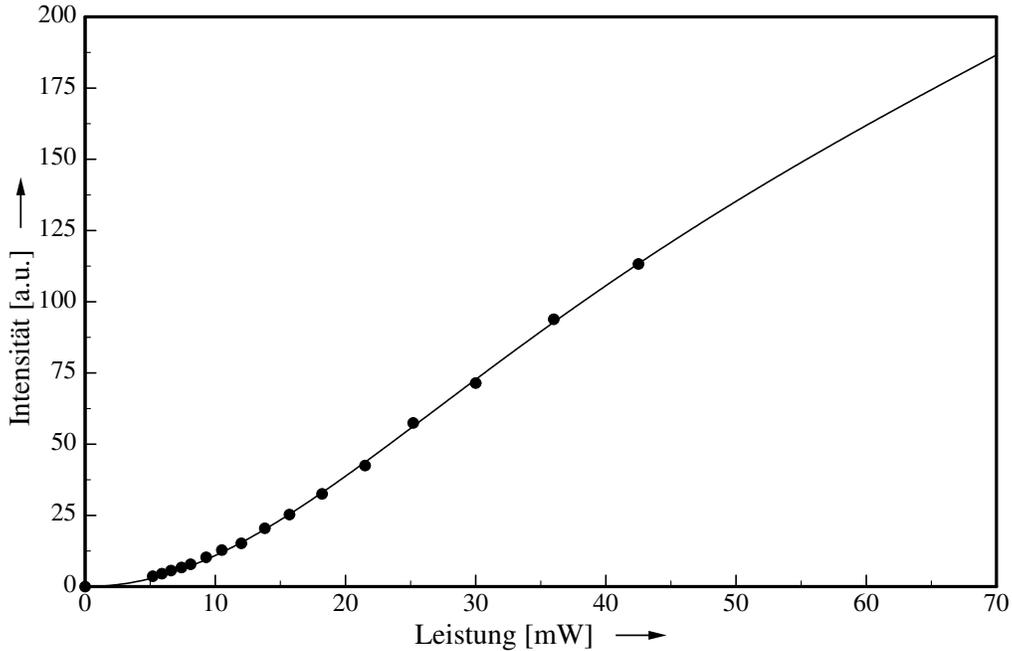


Abb. 3.5: Fluoreszenzintensität von Malachitgrün (10^{-4} molar, in Wasser gelöst) und Fit unter Annahme der ESA nach erfolgter Zwei-Photonen-Absorption

läßt sich die so gemessene Intensitätsabhängigkeit sehr gut durch Gleichung (3.12) beschreiben. In der dargestellten Messung liegen die für den Fit errechneten Parameter bei $\beta = 6,5 \cdot 10^{-4}$ und $\gamma = 4,3 \cdot 10^{-3}$.

Es zeigt sich, daß der erwartete quadratische Zusammenhang zwischen Anregungsintensität und daraus resultierender Fluoreszenz nur in den Bereichen kleiner Intensitäten erfüllt wird.

3.4 Lebensdauerbestimmung an exemplarischen Messungen

Die hier vorgestellten Messungen werden an dem bekannten Triphenylmethan-Farbstoff (TPM) Malachitgrün durchgeführt. In der Literatur gilt dieser wegen seiner geringen Fluoreszenzquantenausbeute häufig als *nonfluorescent*, da Fluoreszenz nur dann beobachtbar [71] ist, wenn durch Anbindung an bestimmte Moleküle das strahlungslose Quenchen reduziert wird. Die Auswahl dieses Farbstoffs läßt sich damit begründen, daß er durch sein Absorptions- und Fluoreszenzspektrum sehr gut in die Rahmenbedingungen des Meßsystems paßt. Sowohl die Lebensdauer der Fluoreszenz aus dem S_2 -Zustand, als auch die aus dem S_1 -Zustand sind so kurz, daß sich das Meßsystem gut in seiner zeitlichen Auflösung klassifizieren läßt. Darüber hinaus ist der Farbstoff Gegenstand häufiger Untersuchungen, so daß eine umfangreiche Datenmenge zur Verifikation herangezogen werden kann [66, 70, 68, 57]. Genauere Informationen zum Molekülaufbau und den spektroskopischen Eigenschaften sind in Kapitel 4 (Seite 45 ff) aufgeführt.

Im folgenden Abschnitt werden die Meßvorgänge beschrieben und die Vorgehensweise der Auswertung erläutert. Die Probenkonzentration beträgt jeweils $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel. Es wird ein Volumen von 100 ml - 150 ml Lösung im Pumpenreservoir (siehe Abbildung 2.10, Seite 17) vorgehalten, damit dem Durchflußsystem ausreichend Material zum Austausch zur Verfügung steht. Die Pumpgeschwindigkeit wird so eingestellt, daß pro Sekunde 8 ml - 9 ml Lösung ausgewechselt werden. Die Temperatur der Lösung, die mit Hilfe eines Magnetrührers permanent durchmischt wird, läßt sich im Reservoir über eine Steuerung vorgeben. In Abbildung 2.11 (Seite 18) ist die eingesetzte Glas-Durchflußküvette dargestellt. Als Frontfenster wird das Deckglas „D 263 M“ der Firma SCHOTT mit einer Stärke von $150 \mu\text{m}$ eingesetzt. So befindet sich der Fokus ca. $100 \mu\text{m}$ in der zu untersuchenden Probe. Die Meßwertaufnahme erfolgt wie in Kapitel 2.7 (Seite 19) beschrieben.

Zuerst werden die Daten bei der Emissionswellenlänge der S_2 -Fluoreszenz von 480 nm aufgenommen. Dazu wird der Mischkristall (CR) (siehe Abbildung 2.6, Seite 12) entsprechend eingestellt und das Interferenzfilter (IF) der Wellenlänge 305 nm eingesetzt. Diese Meßdaten können einerseits zur Berechnung einer Apparatefunktion des Meßsystems genutzt werden, andererseits ist mit ihnen eine direkte Entfaltung der Meßwerte der S_1 -Fluoreszenz möglich.

Nach dem Abfahren der *Delay*strecke erhält man das in Abbildung 3.6 dargestellte Diagramm der Lebensdauermessung. Die Meßdauer pro Kanal beträgt zwei Sekunden, so daß der gesamte Meßvorgang gut eine halbe Stunde dauert. Durch den permanenten Austausch des Probenvolumens kann das Ausbleichen des Farbstoffs vernachlässigt

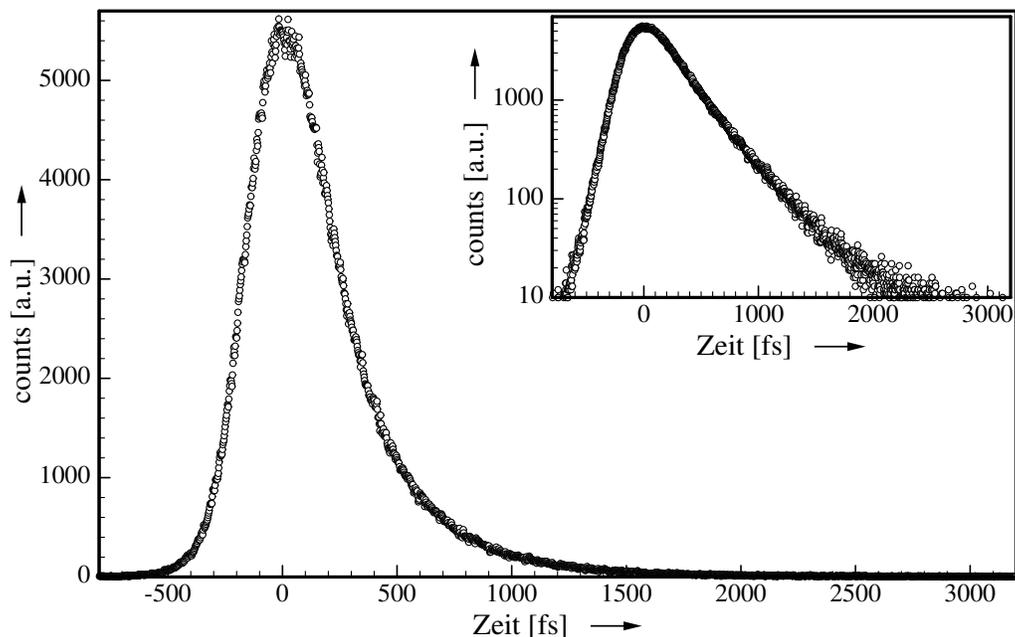


Abb. 3.6: Lebensdauermessung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün bei 480 nm und einer Anregungswellenlänge von 830 nm (in Wasser gelöste Probe, 10^{-4} molar)

werden. Dies läßt sich leicht dadurch überprüfen, daß verschiedene Messungen in Vor- und Rückrichtung des *Delays* aufgenommen werden.

Analog zum Meßvorgang der S_2 -Fluoreszenz werden die Daten für die S_1 -Lebensdauer aufgenommen. Die Pumpgeschwindigkeit, Temperatur und alle weiteren Parameter der Probe bleiben für die Messungen konstant. Nur die Winkelposition des Mischkristalls muß geändert und der Interferenzfilter vor dem Photomultiplier gegen einen der Wellenlänge 370 nm ausgetauscht werden, so daß die S_1 -Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 670 nm detektiert werden kann.

3.4.1 Bestimmung der S_1 -Lebensdauer nach Abschluß der Anregung

In erster Näherung läßt sich die Lebensdauer τ_{S_1} der Fluoreszenz aus dem S_1 -Zustand dadurch bestimmen, daß die Meßwerte zu „späterer Zeit“ durch eine monoexponentielle Funktion (3.13) angepaßt werden. Durch Festlegen des Anpassungs-Zeitfensters auf einen Abschnitt hinter dem Maximum der Lebensdauerkurve ist gewährleistet, daß die Anregung keinen oder nur geringen Einfluß auf den Signalverlauf ausübt.

$$f(t) = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{S_1}}\right) + B \quad (3.13)$$

Zur Ermittlung der Parameter τ_{S_1} , A und B wird die Gleichung (3.13) so umgestellt, daß sich zwei der drei Größen durch lineare Regression berechnen lassen.

$$\ln [f(t) - B] = -\frac{1}{\tau_{S_1}} \cdot t + \ln [A] \quad (3.14)$$

Unter Variation des Parameters B läßt sich nach Gleichung (3.15) die Größe $\tau_{S_1}(B)$ bestimmen. Die als diskrete Werte vorliegenden Zeiten t werden einzelnen Kanälen i zugeordnet, für die gilt, daß $t_{i+1} - t_i = \text{const.}$ ist.

$$\tau_{S_1}(B) = \frac{(\sum_{i=n_1}^{n_2} t_i)^2 - (n_2 - n_1 + 1) \sum_{i=n_1}^{n_2} t_i^2}{(n_2 - n_1 + 1) \sum_{i=n_1}^{n_2} (t_i \cdot \ln[m_{S_1}(t_i) - B]) - \sum_{i=n_1}^{n_2} t_i \sum_{i=n_1}^{n_2} \ln[m_{S_1}(t_i) - B]} \quad (3.15)$$

Ist $\tau_{S_1}(B)$ berechnet, läßt sich der Parameter A in Abhängigkeit von der Größe B durch Gleichung (3.16) bestimmen.

$$A(B) = \exp\left(\frac{\tau_{S_1}(B) \cdot \sum_{i=n_1}^{n_2} \ln[m_{S_1}(t_i) - B] + \sum_{i=n_1}^{n_2} t_i}{\tau_{S_1}(B) \cdot (n_2 - n_1 + 1)}\right) \quad (3.16)$$

Die in Gleichung (3.17) dargestellte Funktion $h(B)$ stellt die Summe der Abstandsquadrate zwischen den gemessenen und errechneten Werten dar. Zur Bestimmung der

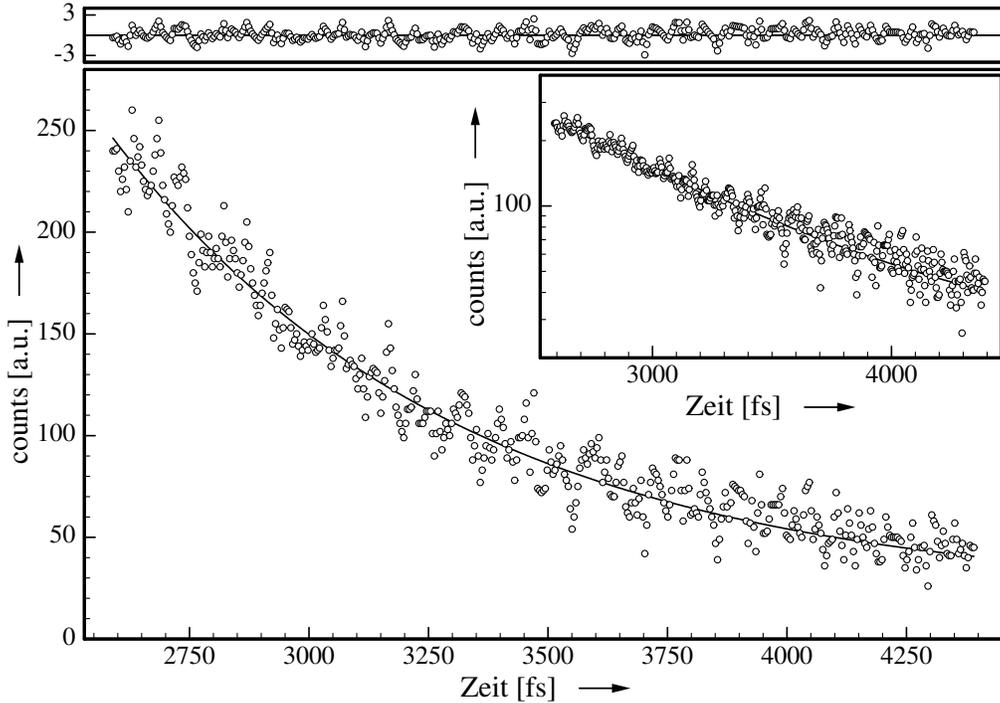


Abb. 3.7: S_1 -Fluoreszenz (\circ) von Malachitgrün nach Abschluß der Anregung („zu späterer Zeit“) aus dem S_2 -Zustand und monoexponentielle Anpassung (—) mit $\tau_{S_1} = 649$ fs

Größe B und der davon abhängigen Parameter wird das Minimum der Funktion $h(B)$ gebildet.

$$h(B) = \sum_{i=n_1}^{n_2} \left[m_{S_1}(t_i) - A(B) \cdot \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_1}(B)}\right) - B \right]^2 \quad (3.17)$$

$$\min h(B) \longrightarrow \tau_{S_1}(B), A(B), B$$

Durch Einsetzen der so errechneten Größen $\tau_{S_1}(B)$, $A(B)$ und B in Gleichung (3.13) erhält man die angepaßte Fitfunktion. Für die in Abbildung 3.7 gezeigte Messung der

S_1 -Fluoreszenz (\circ) von Malachitgrün errechnen sich die Werte $A = 8708$, $B = 25$ und $\tau_{S_1} = 649$ fs. Eine Anpassung wird in einem Bereich von 2,6 ps bis 4,4 ps nach Erreichen des Maximums vorgenommen. Die im oberen Bereich des Diagramms dargestellten Residuen zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung der gemessenen Werte um die errechnete Funktion. Nach der in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Methode berechnet sich das dazugehörige χ^2_{red} zu einem Wert von 1,0.

3.4.2 Entfaltung der S_1 -Meßwerte durch S_2 -Daten

In diesem Abschnitt wird erläutert, wie die Lebensdauer der S_1 -Fluoreszenz mit Hilfe der Daten aus der S_2 -Messung bestimmt werden kann. Damit eine direkte Entfaltung möglich ist, muß darauf geachtet werden, daß die Schrittweite der *Delay*strecke bei den jeweiligen Messungen gleich ist. Eine direkte Entfaltung ist möglich, da die S_1 -Fluoreszenz nur aus dem angeregten S_2 -Zustand hervorgehen kann, wie es in Kapitel 4.1 erklärt wird. Die aus der S_1 -Fluoreszenz-Messung gewonnenen Daten werden

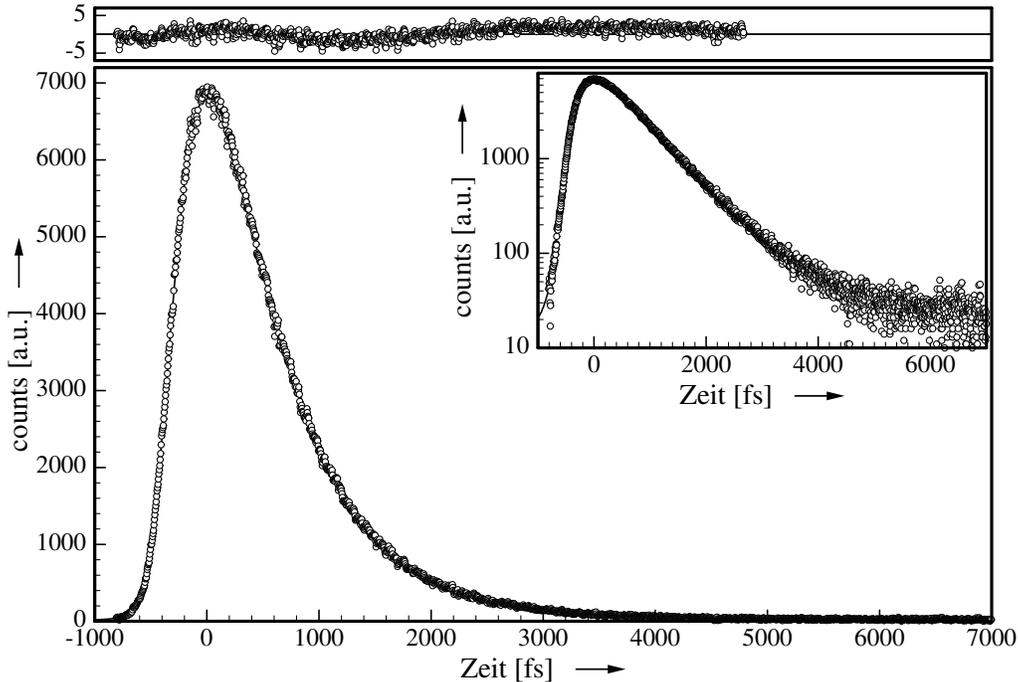


Abb. 3.8: S_1 -Fluoreszenz (\circ) von Malachitgrün und die aus der Faltung einer monoexponentiellen Funktion und den S_2 -Daten errechneten Werte ($-$)

mit Hilfe eines Entfaltungsalgorithmus unter der Programmumgebung MATLAB (siehe Anhang B, Seite 107) ausgewertet. Zur Berechnung der Entfaltung der diskreten S_1 -Meßwerte $m_{S_1}(t_i)$ werden zuerst die S_2 -Daten $m_{S_2}(t_i)$, nachdem der Untergrund subtrahiert wurde, durch abschnittsweise definierte Polynomzüge $p(t_i)$ geglättet.

$$m_{S_2c}(t_i) = m_{S_2}(t_i) - \text{Untergrund} \quad (3.18)$$

Die für eine Verzögerungszeit t gemessenen Werte sind dabei jeweils einem Kanal i zugeordnet.

$$p(t_i) = p_1 t_i^n + p_2 t_i^{n-1} + \dots + p_n t_i + p_{n+1} \quad (3.19)$$

Für die in Gleichung (3.20) dargestellte Summe werden $2 \cdot \Delta i + 1$ Kanäle für die Berechnung herangezogen. Mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet man jeweils für einen Kanal i in dem Abschnitt von $(i - \Delta i)$ bis $(i + \Delta i)$ die Koeffizienten (p_1, \dots, p_{n+1}) des Polynoms. Für Δi hat sich ein Wert von 5 bei der Auswertung der Meßdaten bewährt.

$$g(p_1, \dots, p_{n+1}) = \sum_{r=i-\Delta i}^{i+\Delta i} (m_{S_{2c}}(t_r) - p(t_r))^2 \quad (3.20)$$

Die aus dem Minimum der Fehlerquadrate ermittelten Koeffizienten liefern den Funktionswert $p(i)$ des jeweiligen Kanals, der dem geglätteten Meßwert c_{S_2} an der Stelle i der S_2 -Daten entspricht.

$$\min g(p_1, \dots, p_{n+1}) \longrightarrow p(i) = c_{S_2}(i)$$

Für die beschriebene Glättung eignen sich Polynome zweiten Grades. Die so erhaltenen Daten $c_{S_2}(i)$ werden zur Berechnung der S_1 -Fluoreszenzlebensdauer verwendet. Wie in Gleichung (3.18) wird auch hier zuerst der Untergrund der Meßwerte subtrahiert.

$$m_{S_{1c}} = m_{S_1} - \text{Untergrund} \quad (3.21)$$

Zur Bestimmung der Lebensdauer wird eine Faltung \otimes unter Variation des Parameters τ_{S_1} so durchgeführt, daß die Summe der Abstandskquadrate $f(\tau_{S_1})$ über alle Kanäle in einem ausgewählten Bereich (n_1 bis n_2) minimal wird.

$$f(\tau_{S_1}) = \sum_{i=n_1}^{n_2} \left[m_{S_{1c}}(t_i) - \left(c_{S_2}(t_i) \otimes \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_1}}\right) \right) \right]^2 \quad (3.22)$$

$$\min f(\tau_{S_1}) \longrightarrow \tau_{S_1}$$

Dabei wird von einem monoexponentiellen Zusammenhang zwischen den S_1 -Meßwerten und den S_2 -Daten ausgegangen.

In Abbildung 3.8 sind die gemessenen Werte der S_1 -Fluoreszenz (\circ) und die aus der Faltung der S_2 -Daten mit einer monoexponentiellen Funktion errechneten Werte ($-$) dargestellt. Die Lebensdauer der S_1 -Fluoreszenz des Malachitgrüns in Wasser beträgt hier $623 \text{ fs} \pm 44 \text{ fs}$.

$$R(t_i) = \frac{m_{S_{1c}}(t_i) - \left(c_{S_2}(t_i) \otimes \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_1}}\right) \right)}{\sqrt{m_{S_1}(t_i)}} \quad (3.23)$$

Die nach Gleichung (3.23) berechneten Residuen $R(t_i)$ [74] werden im oberen Fenster der Abbildung 3.8 dargestellt. Sie zeigen bei einem χ^2_{red} , welches durch Gleichung (3.24) zu einem Wert von 1,2 ermittelt wird, daß über das gesamte Meßfenster keine

signifikanten Abweichungen zwischen den Meßwerten und den aus der Faltung errechneten Daten zu erkennen sind.

$$\chi_{red}^2 = \sum_{i=n_1}^{n_2} \frac{\left[m_{S_{1c}}(t_i) - \left(c_{S_2}(t_i) \otimes \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_1}}\right) \right) \right]^2}{(n_2 - n_1 + 1 - k) m_{S_1}(t_i)} \quad (3.24)$$

Die Größe k in Gleichung (3.24) gibt die Anzahl der freien variablen Parameter der Fitkurve wieder. Für eine Poisson-verteilte Wertemenge sollte anhand der Gleichung (3.25) χ_{red}^2 einen Wert um eins annehmen [74].

Bemerkenswert ist, daß sich die komplette Kurve insbesondere des gesamten Anstiegs auf diese Art entfalten läßt. Das zeigt, daß ausschließlich ein monoexponentieller Zusammenhang zwischen der S_1 - und S_2 -Fluoreszenzlebensdauer existiert.

3.4.3 Apparatefunktion aus der Rückfaltung der S_2 -Meßdaten

Die Messung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün in Wasser eignet sich sehr gut zur Ermittlung der Apparatefunktion des Systems. Da die Lebensdauer τ_{S_2} der S_2 -Fluoreszenz aus Literaturdaten [20] und eigenen Messungen (siehe Kapitel 4.2.2, Seite 51) bekannt ist und der in Gleichung (3.25) dargestellte funktionale Zusammenhang gilt, läßt sich aus dem aufgezeichneten Signal $m_{S_2}(t_i)$ und der Annahme des monoexponentiellen Abklingens der S_2 -Fluoreszenz die Apparatefunktion $A(t_i)$ ermitteln.

$$m_{S_2}(t_i) \approx A(t_i) \otimes \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_2}}\right) \quad (3.25)$$

Die Daten der S_2 -Fluoreszenzmessung $m_{S_2}(t_i)$ werden dazu, wie in den Gleichungen (3.18) - (3.20) beschrieben, durch stückweise Anpassung von Polynomzügen geglättet. In Abbildung 3.9 sind die Meßwerte (\circ) und die geglättete Kurve ($-$) dargestellt. Die sehr gleichmäßige Verteilung der Residuen zeigt, daß die geglättete Kurve gut den Verlauf der Meßwerte widerspiegelt. Die Anpassung findet dabei über den kompletten Meßdatensatz statt. Nur im Bereich der Zeiten > 2 ps liefert die Glättung keine stetigen Werte, wie man im Inset anhand der halblogarithmischen Darstellung erkennen kann. Die Werte $m_{S_{2c}}(t_i)$ der geglätteten Kurve und eine angenommene Lebensdauer der S_2 -Fluoreszenz von $\tau_{S_2} = 260$ fs werden zur Berechnung der Apparatefunktion $A(t_i)$ genutzt. Grundlage der Berechnung ist der Algorithmus „deconv“ zur Entfaltung diskreter Werte in Form einer Polynomdivision [75] in der Programmumgebung MATLAB.

$$A(t_i) = \text{deconv} \left[m_{S_{2c}}(t_i); \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_2}}\right) \right]$$

Der so berechnete Kurvenverlauf wird für eine sinnvolle Handhabung stückweise durch Polynomzüge geglättet.

Zur Überprüfung der Qualität der Apparatefunktion wird mit dem Algorithmus (siehe Anhang B, Seite 107) ein τ_{S_2} ermittelt und die Anpassung an die Meßwerte $m_{S_2}(t_i)$ kontrolliert. In Abbildung 3.10 ist im Inset die errechnete geglättete Apparatefunktion zu sehen. Die Funktion verläuft bis auf den unteren Anstieg symmetrisch und besitzt

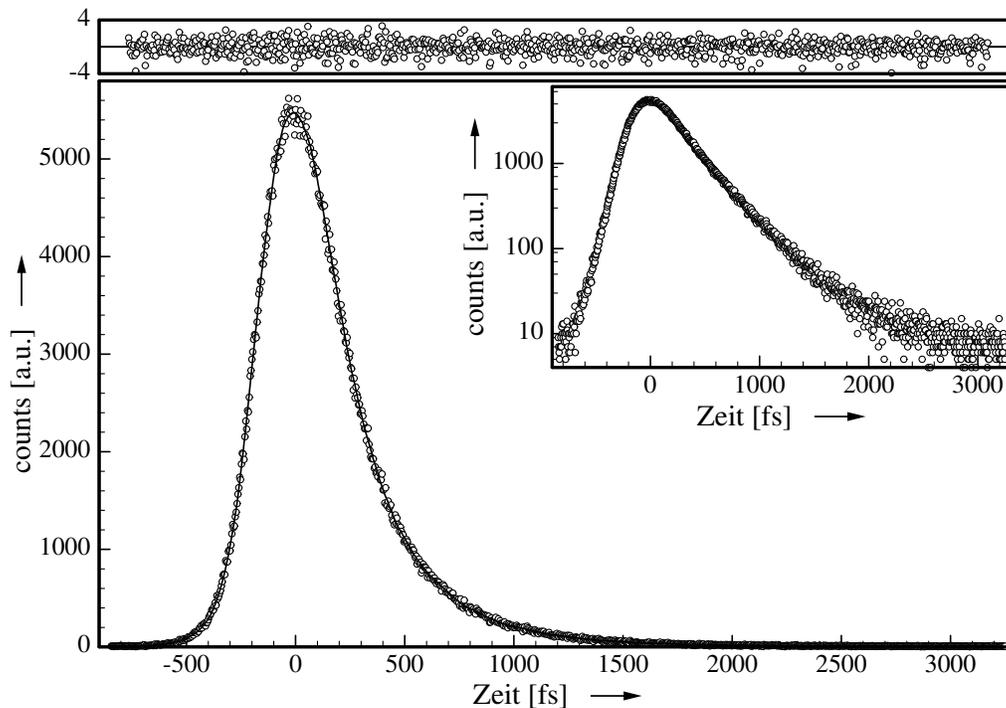


Abb. 3.9: Meßdaten der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün (\circ) und geglättete Kurve (—)

eine Halbwertsbreite von ungefähr 300 fs. Zusätzlich sind die durch Faltung aus der Apparatefunktion und der monoexponentiellen Funktion bestimmten Werte (—) und die Meßwerte $m_{S_2}(t_i)$ als Punkte (\circ) im Diagramm eingezeichnet. Die Lebensdauer von 260 fs für τ_{S_2} wird bestätigt. Auch hier zeigen die Residuen eine sehr gute Anpassung. Diese Überprüfung bestätigt, daß sich die berechnete Funktion sehr gut als Apparatefunktion eignet. In Kapitel 5 werden weitere Möglichkeiten zur Bestimmung einer Apparatefunktion vorgestellt.

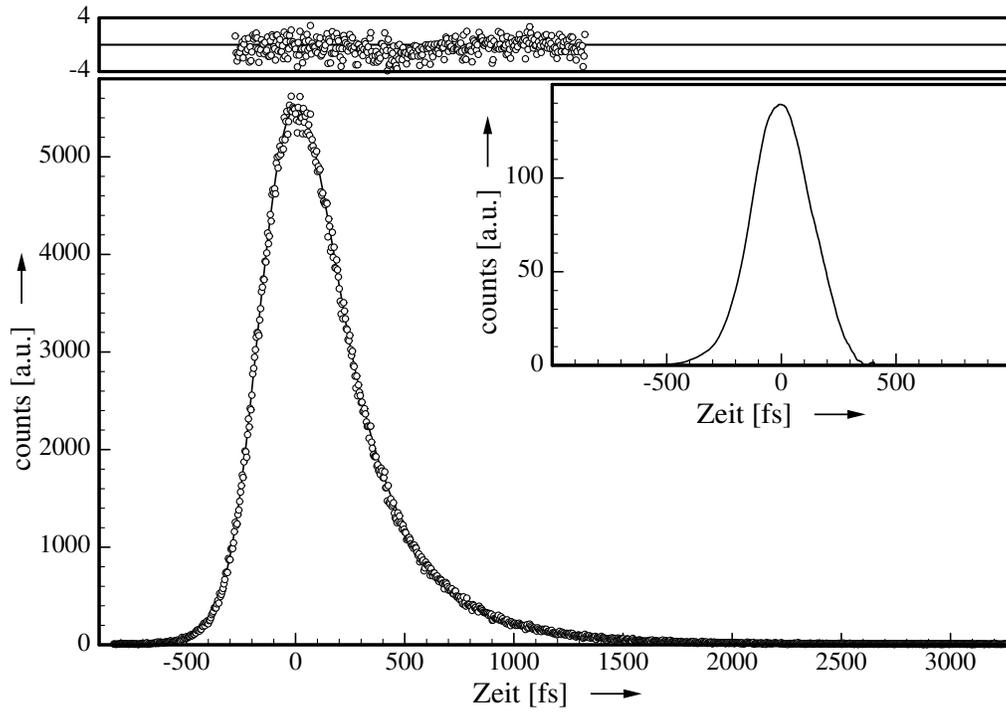


Abb. 3.10: Überprüfung der gerechneten geglätteten und mit einer Exponentialfunktion von $\tau_{S_2} = 260$ fs gefalteten Apparatefunktion (—) mit den gemessenen Werten aus der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün (o). Das Inset zeigt die gerechnete geglättete Apparatefunktion.

3.4.4 Biexponentielle Entfaltung

Eine weitere Möglichkeit, die Lebensdauern für die S_2 - und S_1 -Fluoreszenz zu ermitteln, besteht darin, einen biexponentiellen Fit der gemessenen S_1 -Daten durchzuführen. Analog der in Gleichung (3.25) dargestellten Beziehung ergibt sich folgender biexponentieller Zusammenhang:

$$m_{S_1}(t_i) \approx A(t_i) \otimes \left(\exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_1}}\right) - \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_2}}\right) \right) \quad (3.26)$$

Auch hier wird zur Bestimmung der Parameter τ_{S_1} , τ_{S_2} die Methode der Summe der kleinsten Fehlerquadrate genutzt.

$$u(\tau_{S_1}, \tau_{S_2}) = \sum_{i=n_1}^{n_2} \left[m_{S_1}(t_i) - \left[A(t_i) \otimes \left(\exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_1}}\right) - \exp\left(-\frac{t_i}{\tau_{S_2}}\right) \right) \right] \right]^2 \quad (3.27)$$

$$\min u(\tau_{S_1}, \tau_{S_2}) \longrightarrow \tau_{S_1}, \tau_{S_2}$$

Wie bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben wird, kennzeichnen n_1 und n_2 die obere bzw. untere Grenze des zur Bestimmung der Parameter herangezogenen Zeitfensters. Die Residuen und das χ^2_{red} für die biexponentielle Entfaltung lassen sich analog der in den Gleichungen (3.23) und (3.24) definierten Zusammenhänge ermitteln.

Bei einem biexponentiellen Ansatz zur Berechnung der Lebensdauern für die S_1 - und S_2 -Fluoreszenz (τ_{S_1} , τ_{S_2}) geht man davon aus, daß die S_1 -Fluoreszenz monoexponentiell abklingt. Die Lebensdauer der S_2 -Fluoreszenz wird durch eine zweite exponentielle Komponente, die mit einer negativen Amplitude in die Berechnung eingeht, bestimmt. In der Differenz der beiden Exponentialfunktionen in Gleichung (3.26) kommt diese Annahme zum Ausdruck.

Durch Anwendung des Faltungs-Algorithmus (siehe Anhang B, Seite 107) und durch Einsetzen der in Kapitel 3.4.3 ermittelten Apparatefunktion, erhält man für τ_{S_2} eine Lebensdauer von $260 \text{ fs} \pm 33 \text{ fs}$ und für $\tau_{S_1} = 620 \text{ fs} \pm 40 \text{ fs}$ bei $\chi^2_{red} = 1, 2$. Diese Werte stimmen sehr gut mit den in den vorangehenden Abschnitten (3.4.2; 3.4.3) ermittelten Lebensdauern für die S_1 - und S_2 -Fluoreszenz überein.

In Abbildung 3.11 sind die Meßwerte der S_1 -Fluoreszenz $m_{S_1}(t_i)$ von Malachitgrün (\circ) und die durch den biexponentiellen Fit ermittelten Werte ($-$) dargestellt. Die Residuen zeigen eine gute Anpassung im gesamten Meßfenster. Im Inset sind die Meßdaten und die entsprechende Fit-Funktion in halblogarithmischer Darstellung abgebildet.

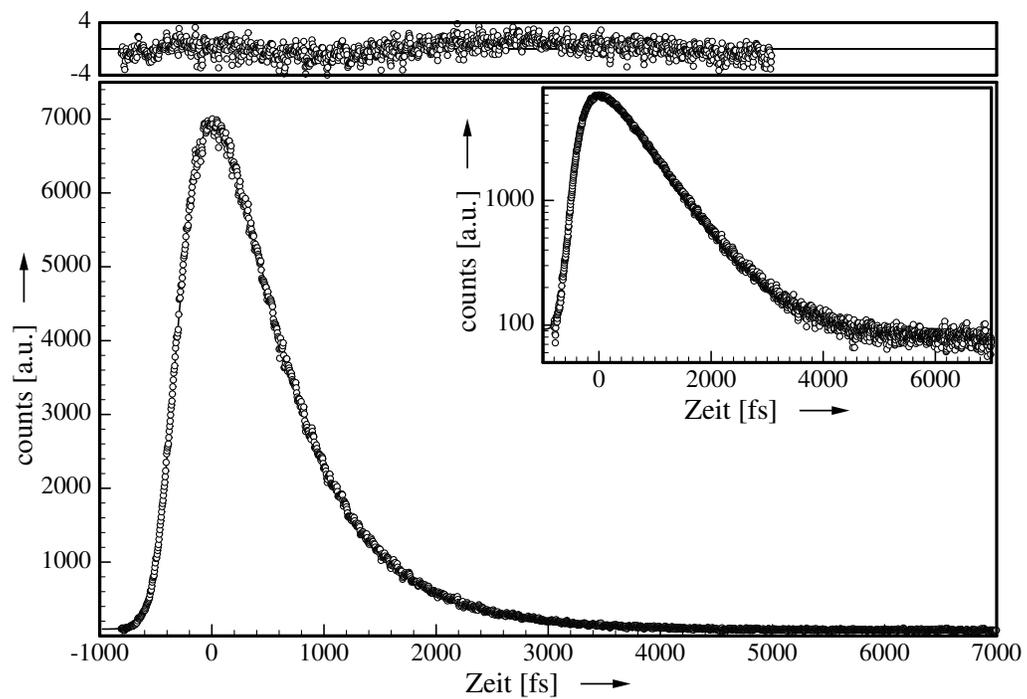


Abb. 3.11: Meßwerte der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün (o) und mit biexponentiellem Ansatz errechnete Fit-Kurve (—)

3.5.1 Transmissionsmessungen an Malachitgrün

Die Auswertung für die in der Transmissionsanordnung gemessenen Werte stimmt in seiner Durchführung mit dem für die Reflexionsmessung angewandten Verfahren (siehe Kapitel 3.4) überein. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Transmissionsmessungen vorgestellt und Unterschiede zu den Reflexionsmessungen erläutert.

Zuerst wird die Apparatefunktion mit Hilfe der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün, wie in Kapitel 3.4.3 für die Reflexionsanordnung beschrieben, für den Transmissionsaufbau bestimmt. Dazu wird ein monoexponentielles Abklingen der S_2 -Fluoreszenz mit einer Lebensdauer $\tau_{S_2}=260$ fs angenommen und aus der Rückfaltung der Meßdaten die Apparatefunktion ermittelt, die anschließend durch Polynomzüge geglättet wird. Zum

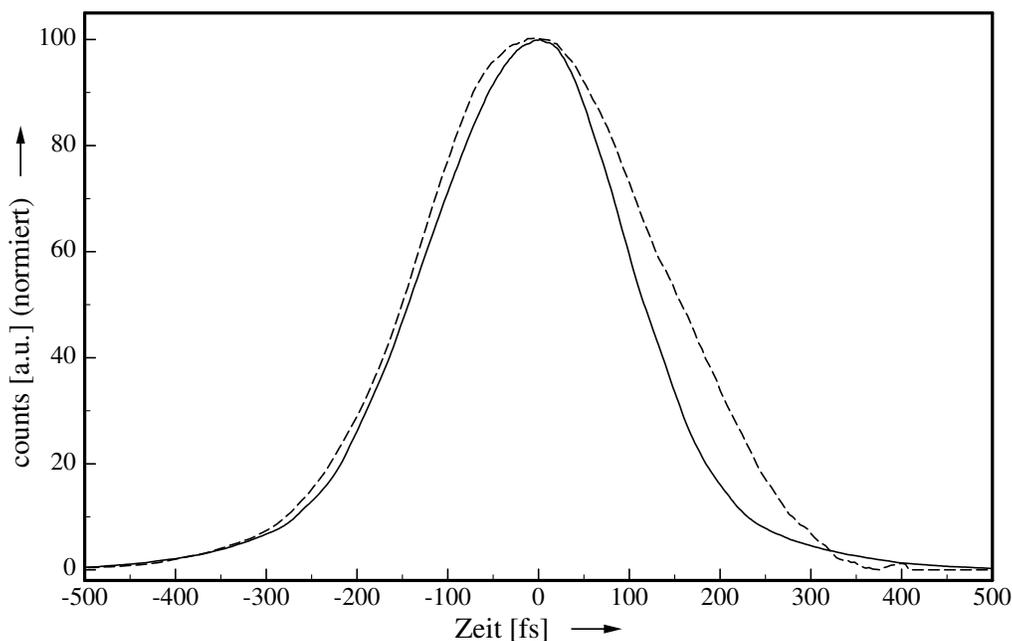


Abb. 3.13: Geglättete Apparatefunktionen der Reflexions- (- -) und Transmissionsanordnung (—)

Vergleich der aus der Rückfaltung in Reflexions- (- -) und Transmissionsanordnung (-) gewonnenen geglätteten Apparatefunktionen sind diese in Abbildung 3.13 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Halbwertsbreite der aus der Transmissionsanordnung ermittelten Apparatefunktion etwas kleiner ist als die aus der Reflexionsanordnung. Zur Überprüfung der in Transmissionsanordnung bestimmten Apparatefunktion werden die Daten der Malachitgrün-Messung mit dieser entfaltet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Dort sind die Meßwerte der S_2 -Fluoreszenz (\circ) und die mit Hilfe der Apparatefunktion errechnete Fit-Kurve (—) abgebildet. Die aus dem Fit errechnete Größe für die Lebensdauer der S_2 -Fluoreszenz liegt bei $\tau_{S_2} = 254 \text{ fs} \pm 31 \text{ fs}$ mit $\chi^2_{red} = 1,1$. Wie auch an der halblogarithmischen Darstellung im Inset zu erkennen ist, weisen die Residuen eine gute Anpassung der errechneten Funktion an die gemessenen Werte auf. In Abbildung 3.15 sind die Meßwerte der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün aus der Transmissionsmessung dargestellt. Wie in Kapitel 3.4.4 vorgestellt, erfolgt das Entfal-

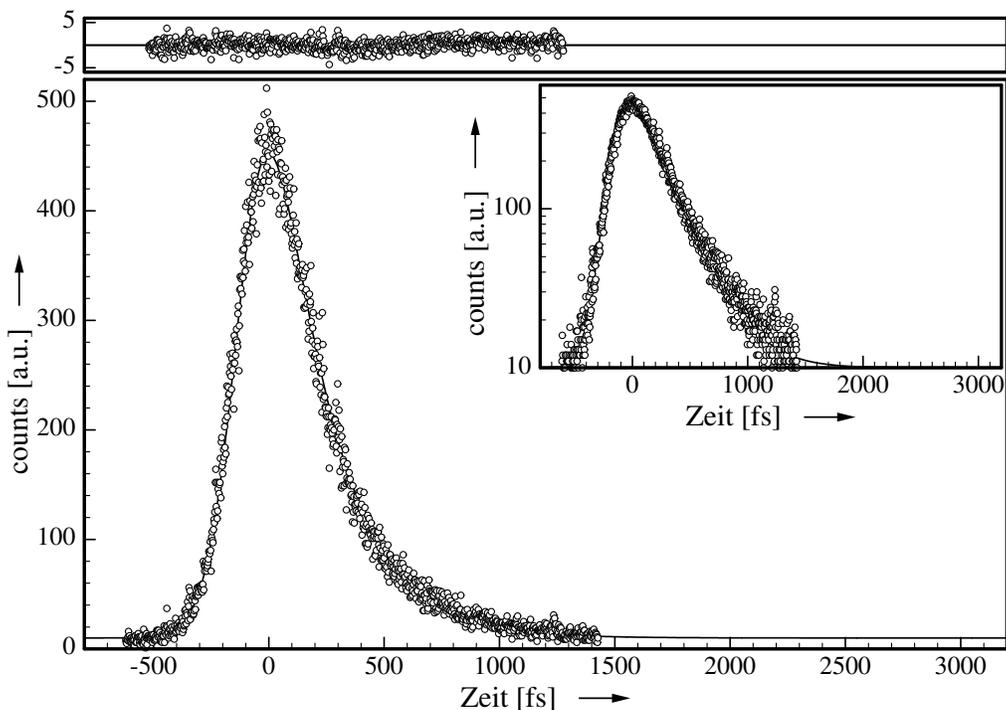


Abb. 3.14: S_2 -Fluoreszenz (\circ) von Malachitgrün in Transmissionsanordnung und aus der Apparatefunktion errechnete Fit-Kurve (—)

ten der S_1 -Fluoreszenz-Meßdaten mit Hilfe der Apparatefunktion und eines biexponentiellen Ansatzes für den zeitlichen Verlauf. Neben den Meßwerten ist auch die aus der Apparatefunktion und dem biexponentiellen Ansatz errechnete Fit-Kurve in dem Diagramm aufgetragen. Wiederum zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den beiden Kurven, was durch die gleichmäßige Verteilung der Residuen und einem χ^2_{red} von 1,3 belegt wird. Die S_1 -Fluoreszenz klingt monoexponentiell mit $628 \text{ fs} \pm 39 \text{ fs}$ ab. Die zweite exponentielle Komponente mit einer negativen Amplitude hat den Wert von $261 \text{ fs} \pm 33 \text{ fs}$ und beschreibt das Auffüllen des S_1 -Zustandes. Das entspricht der Lebensdauer des S_2 -Zustandes.

Die in Transmissionsanordnung bestimmten Lebensdauern für die S_1 - und S_2 -Fluoreszenz stimmen sehr gut mit den in Reflexion gemessenen Werten überein.

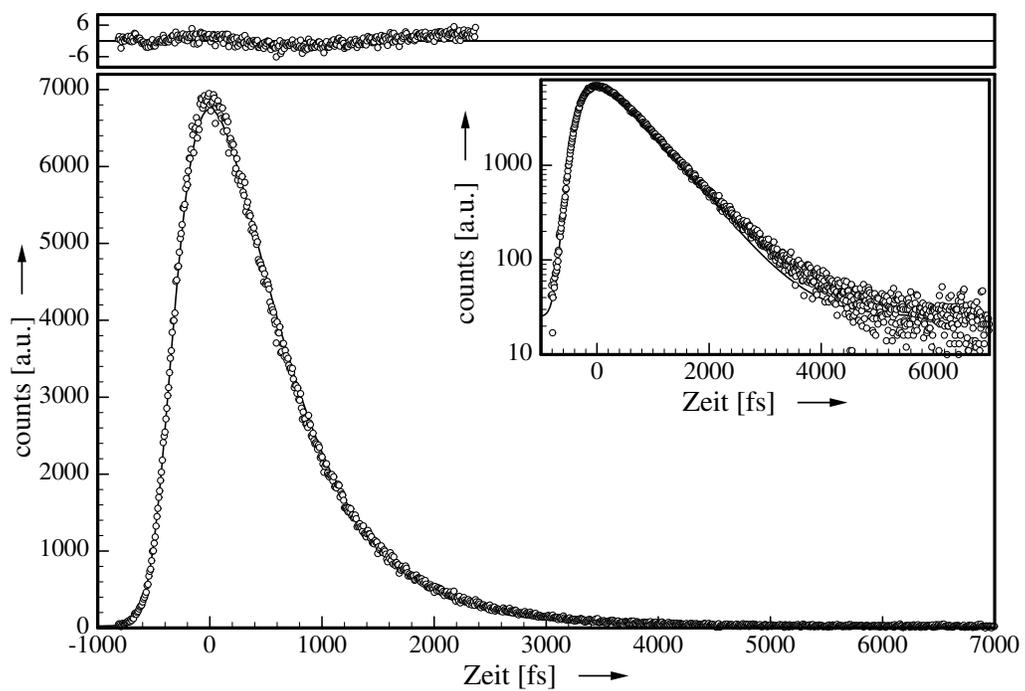


Abb. 3.15: S_1 -Fluoreszenz (\circ) von Malachitgrün in Transmissionsanordnung und aus dem biexponentiellen Ansatz und der Apparatefunktion errechnete Fit-Kurve ($-$)

3.6 Meßgenauigkeit und Abschätzung der Fehler

Um den Toleranzbereich der durch den Algorithmus (siehe Anhang B, Seite 107) ermittelten Größen zu bestimmen, ist eine Berechnung in Form einer Fehlerfortpflanzung aufgrund der voneinander abhängigen Parameter nicht geeignet. Vielmehr müssen die zulässigen Abweichungen für die berechneten Parameter durch Variation bestimmt werden.

Die Vorgehensweise wird im folgenden Beispiel beschrieben. In Gleichung (3.28) ist in vereinfachter Form die Berechnung der Summe des Fehlerquadrates in Abhängigkeit vom Parameter τ dargestellt. In die Berechnung von $f(\tau)$ gehen die Messwerte $m(t_i)$ und die berechneten Funktionswerte $h(t_i, \tau)$ an den Stellen t_i ein.

$$f(\tau) = \sum_i [m(t_i) - h(t_i, \tau)]^2 \quad (3.28)$$

Der Optimierungsalgorithmus „fminsearch“ [61] aus der Programmumgebung MATLAB variiert τ soweit, daß $f(\tau)$ minimal wird. Das Programm liefert genau einen Wert für die zu bestimmende Größe τ .

Im nächsten Schritt wird τ in der Deltaumgebung x variiert und der Funktionswert $f(\tau \pm \Delta x)$ betrachtet.

$$f(\tau \pm \Delta x) = \sum_i [m(t_i) - h(t_i, \tau \pm \Delta x)]^2 \quad (3.29)$$

Das in Gleichung (3.29) aufgeführte Δx wird dazu so lange verkleinert bzw. vergrößert, bis $f(\tau \pm \Delta x)$ aus der $\frac{\sigma}{2}$ -Umgebung von $f(\tau)$ herausläuft. Die so ermittelten Grenzen legen die Ränder des zulässigen Toleranzbereichs fest.

Zur Beurteilung der Qualität einer Messung gibt es verschiedene Parameter: Zum einen zeigen die Residuen an, wie gleichmäßig die Meßwerte um die gerechnete Funktion verteilt sind, und ob Bereiche existieren, die durch die errechnete Kurve nicht an die Meßwerte angepaßt werden können. Daraus resultiert das in Gleichung (3.24) genau beschriebene χ^2_{red} .

Zum anderen liefert die in diesem Abschnitt beschriebene Berechnung des Toleranzbereichs ein Maß zur Beurteilung der Genauigkeit der Messung und gibt den Fehlerbereich des ermittelten Parameters an.

Die in den Gleichungen (3.28) und (3.29) dargestellten Berechnungen können analog auf Funktionen mit mehreren freien Parametern übertragen werden. Zur Ermittlung des Toleranzbereichs wird dann jeweils nur ein Parameter in der Deltaumgebung variiert.

Kapitel 4

Weitere Messungen an Malachitgrün

Inhalt dieses Kapitels sind die am Farbstoff Malachitgrün durchgeführten Lebensdauerermessungen. Dieser bekannte Triphenylmethanfarbstoff (TPM) zeichnet sich für die Experimente mit Zwei-Photonen-angeregter Fluoreszenz im Femtosekunden-Zeitfenster durch mehrere Eigenschaften aus. Zum einen besitzt er recht kurze Fluoreszenzlebensdauern und zum anderen paßt er mit seinen optischen Eigenschaften sehr gut in die Rahmenbedingungen, die durch das Meßsystem vorgegeben sind. Dies bezieht sich einerseits auf die optische Transparenz bei der Laserwellenlänge (830 nm), andererseits auf die gute Absorption (siehe Abbildung 4.4) im Bereich der Zwei-Photonen-Anregung (415 nm) und die daraus resultierenden Fluoreszenzwellenlängen.

Zuerst wird die Struktur des Farbstoffs erläutert und auf dessen Eigenschaften eingegangen. Anschließend werden Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauer-Messungen an in Ethanol gelösten Proben vorgestellt. Die Meßergebnisse werden mit denen der in Wasser gelösten Proben verglichen und nach dem in Kapitel 3.4 dargestellten Verfahren ausgewertet. Darüber hinaus wird der Einfluß der Viskosität auf die Lebensdauern betrachtet. Abschließend werden Messungen an festen Malachitgrün-Proben vorgestellt.

4.1 Der Farbstoff Malachitgrün

Malachitgrün (auch 4,4-Bis(dimethylamino)tritylium-oxalat) ist ein bekannter Vertreter der Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe, der erstmals 1877/78 von Fischer und Doebner hergestellt worden ist [11]. Der Farbstoff findet unter anderem aufgrund seiner stark antibakteriellen Eigenschaften seine Verwendung in der Teichwirtschaft zur Bekämpfung von Verpilzungen. Auch wird er als Desinfektionsmittel und als Mikroskopierfarbstoff eingesetzt [84]. In Abbildung 4.1 ist die Strukturformel von Malachitgrün als Oxalat dargestellt. Diese Salze des Farbstoffs bilden grüne, metallisch glänzende Kristalle, die sowohl in Wasser als auch in Ethanol gut löslich sind. Das aufgrund seines großen delokalisierten π -Elektronensystem für die Farbigekeit verantwortliche Kation besitzt in seiner Struktur drei an ein zentrales Kohlenstoffatom gebundene Phenylgruppen, von denen zwei mit je einer funktionellen Dimethylamino-Gruppe ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) substituiert sind [36]. Eine genauere Erklärung der Farbigekeit der Triphenylmethan-

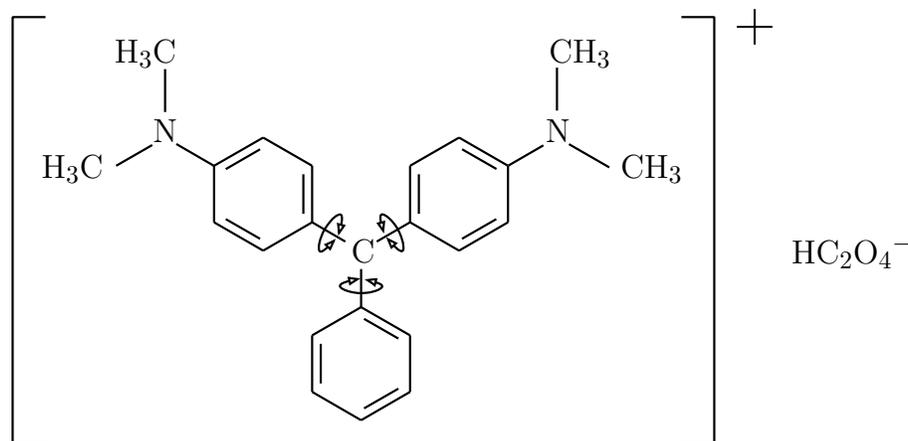


Abb. 4.1: Strukturformel des Farbstoffs Malachitgrün (als Oxalat). Die freie Drehbarkeit der Phenylgruppen am zentralen Kohlenstoffatom wird durch Pfeile angedeutet.

farbstoffe erfolgt in Kapitel 6.1.

Unter Lichteinwirkung bleicht der Farbstoff leicht aus, da durch Oxidation eine aromatische Gruppe aus dem Molekül verdrängt wird (siehe Abbildung 4.2).

In Abbildung 4.1 ist die freie Drehbarkeit der Phenylringe um das Carbeniumion durch Pfeile angedeutet. Da eine starke Kopplung zwischen den elektronisch ange-

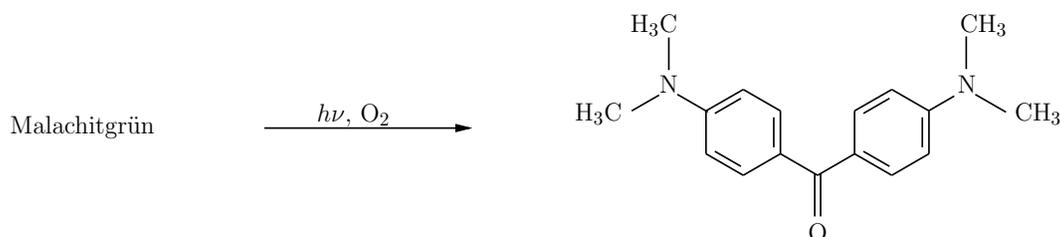


Abb. 4.2: Oxidation von Malachitgrün durch Lichteinfluß unter Abgabe einer aromatischen Gruppe (nach [108])

regten Zuständen und dieser freien Drehbarkeit der Phenylringe besteht, ist die Dynamik der Relaxationsprozesse in Lösungsmitteln mit geringer Viskosität sehr hoch [1, 114, 66, 68, 20]. Die Winkel zwischen dem zentralen Kohlenstoffatom und der Ebene der Phenylringe beeinflussen die elektronisch angeregten Zustände des Moleküls. Daraus resultiert die oben genannte Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Viskosität des Lösungsmittels [93, 92, 15, 16, 17].

In Abbildung 4.3 sind die Potentialkurven der Singulettzustände des Malachitgrün über der Drehung des nicht substituierten Phenylrings aufgetragen. Dieses Modell nach Bhaskuttan et al. [20] zeigt neben dem S_1 - und S_2 -Zustand auch die Absorption, die S_2 -Fluoreszenz und die nach der inneren Umwandlung entstehende S_1 -Fluoreszenz. Nach Absorption in die höher angeregten Zustände des S_2 -Niveaus relaxiert das Molekül durch innere Umwandlung in den Grundzustand des angeregten S_2 -Niveaus. Von dort kann es unter Abgabe eines Fluoreszenzphotons in den angeregten Grundzustand S_0 oder durch innere Umwandlung in den Grundzustand des angeregten S_1 -Niveaus ge-

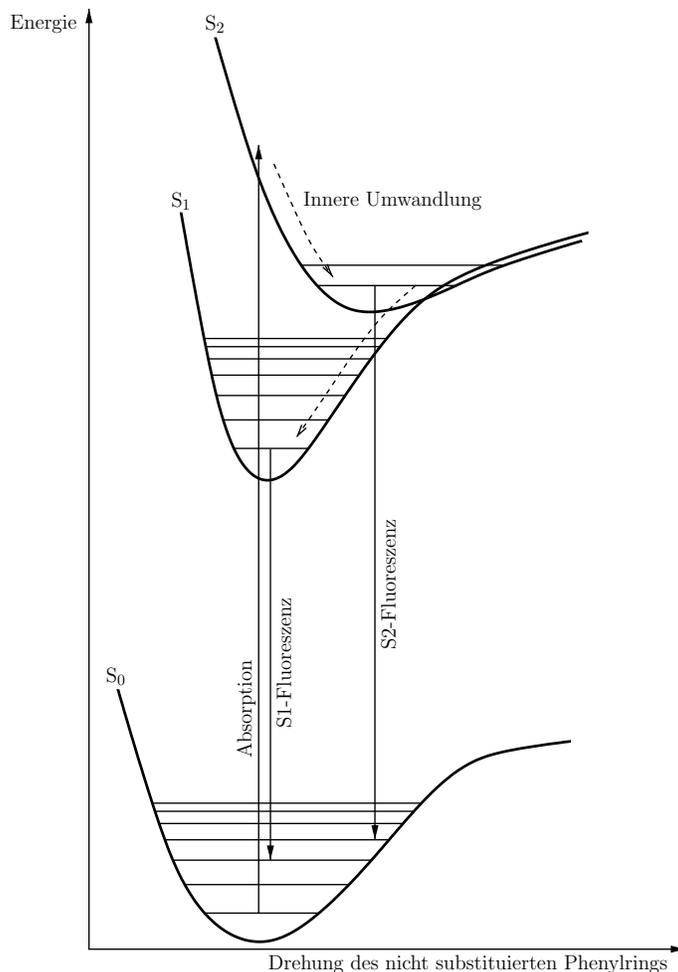


Abb. 4.3: Potentialkurven-Modell der Singulettzustände des Malachitgrün unter Berücksichtigung der Drehung des nicht substituierten Phenylrings (nach [20]). Dargestellt sind die Absorption in den S_2 -Zustand, die daraus resultierende S_2 -Fluoreszenz und die nach innerer Umwandlung mögliche S_1 -Fluoreszenz in Abhängigkeit der Kinetik des Systems.

langen. Auch dort kann unter Abgabe eines Fluoreszenzphotons der Grundzustand S_0 erreicht werden.

Aus der durch *pump-and-probe*-Messungen bestimmten Relaxations-Kinetik [114, 70, 68] läßt sich schließen, daß nach Absorption in das S_2 -Niveau eine Drehung des Phenylrings zu einer energetisch günstigeren Konfiguration hin abläuft. Dabei kann aus diesem angeregten Zustand die so bezeichnete S_2 -Fluoreszenz entstehen. Während der Drehbewegung des Phenylrings kommt es zu einem Schnitt der Potentialflächen des S_2 - und S_1 -Niveaus. Damit verbunden ist die Möglichkeit, durch innere Umwandlung über die vibratorischen Zustände in den elektronisch angeregten Grundzustand des S_1 -Niveaus zu gelangen.

In dem UPC-Aufbau lassen sich die Lebensdauern des S_2 - und S_1 -Zustandes mit großer Genauigkeit bestimmen. Die Abhängigkeit der S_1 -Fluoreszenzlebensdauer von der Vis-

kosität des Lösungsmittels wird in Kapitel 4.3 gezeigt.

4.2 Malachitgrün im Lösungsmittel Ethanol

Gelöste Proben lassen sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung gut präparieren und sind daher von besonderem Interesse. In diesem Abschnitt sind die Meßergebnisse der Lebensdauermessungen von in Ethanol gelösten Malachitgrünproben aufgeführt. Diese erlauben einen Vergleich zu den in Kapitel 3.4 und aus Literaturangaben [114, 68, 20] bekannten Meßdaten.

Abbildung 4.4 zeigt das Absorptionsspektrum von in Ethanol gelöstem Malachitgrün. Deutlich zu erkennen sind die Absorptionsbanden bei 425 nm und 620 nm für das Errei-

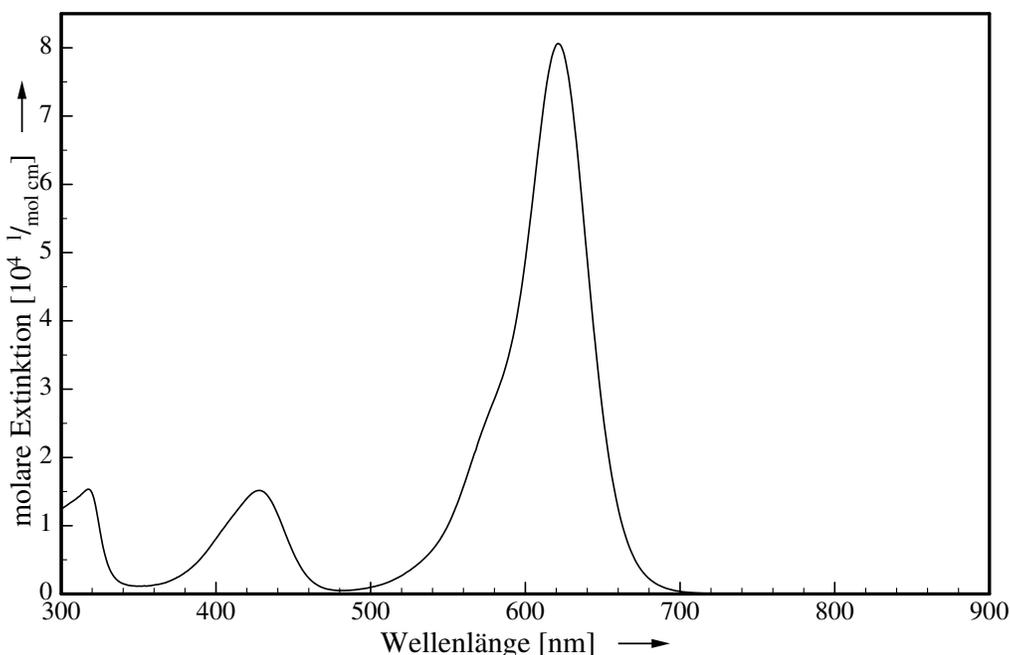


Abb. 4.4: Absorptionsspektrum von Malachitgrün im Lösungsmittel Ethanol

chen des S_2 - und S_1 -Niveaus. Die Fluoreszenzmaxima liegen bei 480 nm für die strahlende Relaxation aus dem S_2 -Niveau bzw. bei 670 nm aus dem S_1 -Niveau. Für die Anregungswellenlänge von 830 nm ist die Lösung dagegen vollständig transparent. Um Reabsorptionseffekte zu vermeiden, werden hier 10^{-4} molare Lösungen verwendet.

4.2.1 Die S_1 -Fluoreszenzmessung an Malachitgrün

Der Meßvorgang an in Ethanol gelöstem Malachitgrün orientiert sich an dem der in Wasser gelösten Proben. Das kontinuierliche Pumpen des Probenvolumens durch die Durchflußküvette während der Messung verhindert ein partielles Ausbleichen des Farbstoffs. Die Meßwertaufnahme findet wie im Kapitel 2.7 beschrieben statt. Während der Messung mit Ethanol als Lösungsmittel ist ein permanenter Materialaustausch wichtig,

da es bei geringer Fließgeschwindigkeit durch thermische Einflüsse zu lokalen Lasing-Effekten [45, 105] kommt, die bei den Messungen in Wasser nicht festzustellen sind. Dies läßt sich auf die größere Wärmeleitfähigkeit und Wärmekapazität von Wasser zurückführen (siehe Tabelle 4.1). Zur Bestimmung der Lebensdauer des S_1 -Zustandes τ_{S_1}

	Wärmeleitfähigkeit $\left[\frac{\text{W}}{\text{mK}}\right]$	Wärmekapazität $\left[\frac{\text{kJ}}{\text{kg K}}\right]$
Wasser (dest.)	0,63	4,18
Ethanol	0,17	2,43

Tab. 4.1: Vergleich der Wärmeleitfähigkeit und Wärmekapazität von Wasser und Ethanol aus Taschenbuch der Physik [60].

werden Messungen bei den Wellenlängen der S_1 - und S_2 -Fluoreszenz durchgeführt. Der zweite Datensatz stellt dabei die Anregungs- und Apparatefunktion dar, mit dem eine direkte Entfaltung der S_1 -Meßwerte vorgenommen wird. Abbildung 4.5 zeigt das über-

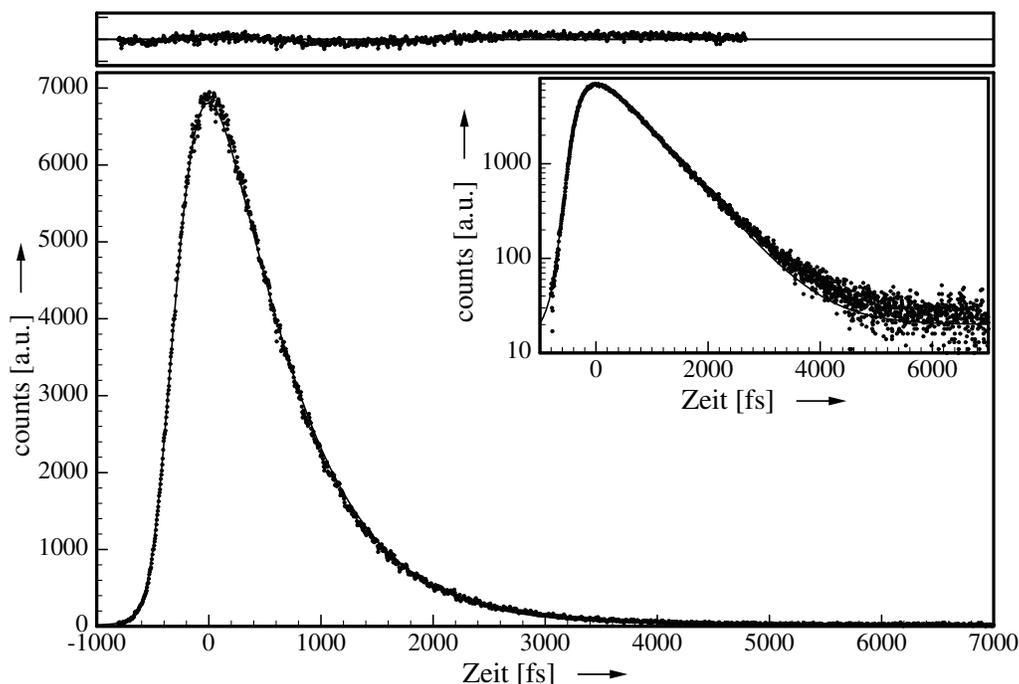


Abb. 4.5: Messwerte der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün in Ethanol (\circ). Als Fit ist die Funktion aus der Faltung der S_2 -Fluoreszenzdaten mit der durch τ_{S_1} berechneten Exponentialfunktion ($-$) dargestellt.

zeugende Ergebnis, daß auch im Lösungsmittel Ethanol der S_1 -Zustand vollständig aus dem S_2 -Zustand gefüllt wird, da es sich bestätigt, daß ein direkter monoexponentieller Zusammenhang zwischen den beiden Meßreihen existiert.

Es ergibt sich nach Auswertung und Entfaltung der Daten eine Lebensdauer von $926 \text{ fs} \pm 64 \text{ fs}$ mit einem χ^2_{red} von 1,4. Vergleicht man die Ergebnisse der S_1 -Fluoreszenz-

	Lebensdauer τ_{S_1} [fs]	Toleranz [fs]	χ^2_{red}
Wasser	623	± 44	1,2
Ethanol	926	± 64	1,4

Tab. 4.2: Vergleich der Lebensdauern der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün für die Lösungsmittel Wasser und Ethanol, ermittelt aus der Entfaltung durch die S_2 -Daten.

lebensdauer von Malachitgrün im Lösungsmittel Ethanol mit denen der in Wasser gelösten Proben, so ist bei diesen die Lebensdauer um fast 50% länger (siehe Tabelle 4.2). In Abbildung 4.6 sind die Meßdaten der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün, gelöst in

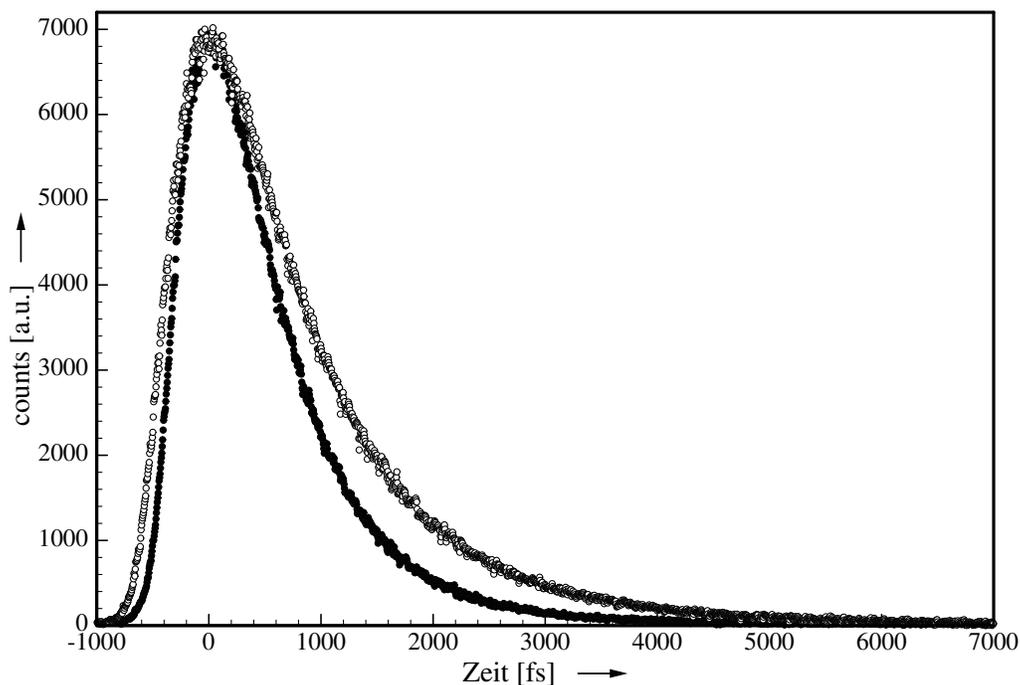


Abb. 4.6: Vergleich der S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün in den Lösungsmitteln Wasser (●) und Ethanol (○)

Wasser (●) und Ethanol (○), dargestellt. Hier läßt sich sowohl ein etwas langsamerer Anstieg als auch eine längere Abklingdauer des Fluoreszenzsignals bei den in Ethanol gelösten Proben ablesen. Die unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauer kann mit der Änderung der Viskosität des Lösungsmittels (siehe Tabelle 4.3), wie in Kapitel 4.1 beschrieben, erklärt werden.

Die Daten bestätigen die von Yoshizawa et al. [114] und von Bhasikuttan et al. [20] in einer neueren Arbeit in einem ähnlichen Versuch ermittelten Ergebnisse für die S_1 -Lebensdauern von Malachitgrün in den Lösungsmitteln Wasser ($\tau_{S_1}=540$ fs ± 60 fs) und Ethanol ($\tau_{S_1}=800$ fs ± 60 fs). Die dort allerdings nach Ein-Photon-Anregung bestimmten Fluoreszenzlebensdauern sind zwar etwas kürzer, weisen dafür aber auch wesentlich größere Streubreiten auf.

Aus der Änderung der Lebensdauer resultiert ebenfalls eine geringfügige Veränderung

	Dichte [$\frac{\text{kg}}{\text{l}}$]	Brechungsindex	Viskosität [mPa s]
Wasser	0,998	1,3333	1,056
Ethanol	0,791	1,3614	1,22

Tab. 4.3: Vergleich der Dichte, des Brechungsindex und der Viskosität für Wasser und Ethanol bei 291 K aus Lexikon der Chemie [84].

des Signalanstiegs. Im nächsten Abschnitt werden Meßergebnisse zur S_2 -Fluoreszenzlebensdauer vorgestellt und mit den Ergebnissen an den in Wasser gelösten Proben verglichen.

4.2.2 Die S_2 -Fluoreszenzmessung an Malachitgrün

In der Abbildung 4.7 sind die beiden Kurven der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün in Wasser (\bullet) und Ethanol (\circ) dargestellt. Hier ist nur ein kleiner Unterschied im Anstiegsverhalten und in der Fluoreszenzlebensdauer zu erkennen. Dadurch wird die in Kapitel 4.1 aufgestellte Annahme, daß die S_2 -Fluoreszenz-Lebensdauer unabhängig von der Viskosität des Lösungsmittels ist, bestätigt. Um diese kurzen Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen, ist es notwendig, eine Entfaltung mit Hilfe der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Apparatfunktionen vorzunehmen. Aus der Messung der S_2 -Fluoreszenz

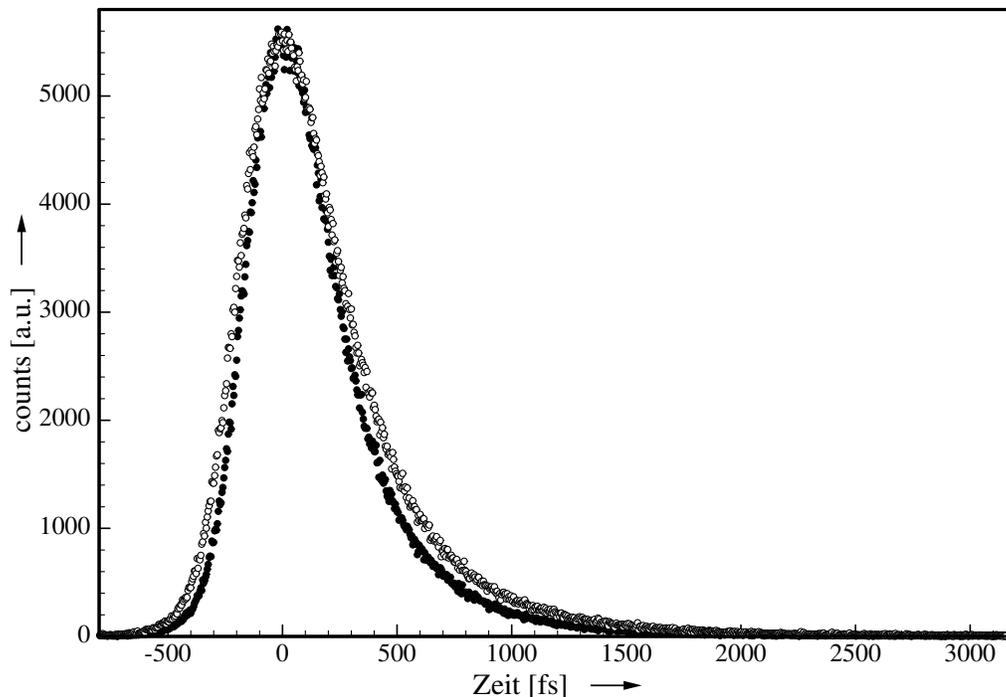


Abb. 4.7: Vergleich der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün in den Lösungsmitteln Wasser (\bullet) und Ethanol (\circ)

in Ethanol wird eine Lebensdauer von $279 \text{ fs} \pm 32 \text{ fs}$ mit einem χ^2_{red} von 1,3 ermit-

telt, die damit nur geringfügig länger ist als der in Wasser gemessene Wert von 260 fs. Auch bei der Bestimmung der Lebensdauern der S₂-Fluoreszenz ergeben sich gering-

	Lebensdauer τ_{S_2} [fs]	Toleranz [fs]	χ^2_{red}
Wasser	260	± 33	1,2
Ethanol	279	± 32	1,3

Tab. 4.4: Vergleich der Lebensdauern der S₂-Fluoreszenz von Malachitgrün für die Lösungsmittel Wasser und Ethanol, die aus der Entfaltung durch die Apparatfunktion ermittelt wurden.

fürige Abweichungen von dem durch Yoshizawa et al. [114] im Lösungsmittel Wasser bestimmten Wert von $\tau_{S_2}=270 \text{ fs} \pm 50 \text{ fs}$ und für den von Bhasikuttan et al. [20] im Lösungsmittel Ethanol ermittelten Wert von $\tau_{S_2}=265 \text{ fs} \pm 20 \text{ fs}$. Wie bereits beim Vergleich der S₁-Messungen erwähnt, sind auch hier die Streubreiten bei den in der Literatur angegebenen Werten viel größer als bei den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen.

4.3 Viskositätsabhängige Messungen

Um die in Kapitel 4.1 aufgestellten Annahmen zu überprüfen, werden Messungen an Lösungen mit unterschiedlicher Viskosität durchgeführt [86, 17, 114, 20]. Dazu wird das Mischungsverhältnis eines Ethanol/Glykol-Gemisches variiert und mit Hilfe eines Kapillarrisosimeters die Viskosität des Lösungsmittels bestimmt.

In Abbildung 4.8 werden exemplarisch die Lebensdauermessungen der S₂-Fluoreszenz von Malachitgrün in zwei Lösungsmittelgemischen der Viskositäten 1 mPa·s (○) und 20 mPa·s (●) gezeigt. Die Messungen zeigen, daß die S₂-Lebensdauer nur in sehr geringem Umfang von der Viskosität des Lösungsmittels abhängt. Der Wert liegt bei 300 fs und liegt damit im Bereich der Ergebnisse aus den Messungen mit den Lösungsmitteln Ethanol und Wasser.

Eine Aufteilung der S₂-Fluoreszenzlebensdauer in eine schnelle und langsame Komponente, wie sie von Yoshizawa et al. [114] angenommen wird, konnte nicht festgestellt werden. In Abbildung 4.9 ist die Lebensdauer der S₁-Fluoreszenz von Malachitgrün in Abhängigkeit von der Viskosität des Lösungsmittels aufgetragen. In dieser doppelt-logarithmischen Darstellung werden sowohl die Meßpunkte als auch die zugehörige Regressionsgerade mit einer Steigung von 0,64 gezeigt. Der Regressionskoeffizient von 0,98 zeigt eine gute Anpassung. Dies entspricht der Annahme [93, 92, 15, 16, 17], daß eine $\eta^{2/3}$ -Abhängigkeit zwischen der S₁-Fluoreszenzlebensdauer und der Viskosität besteht.

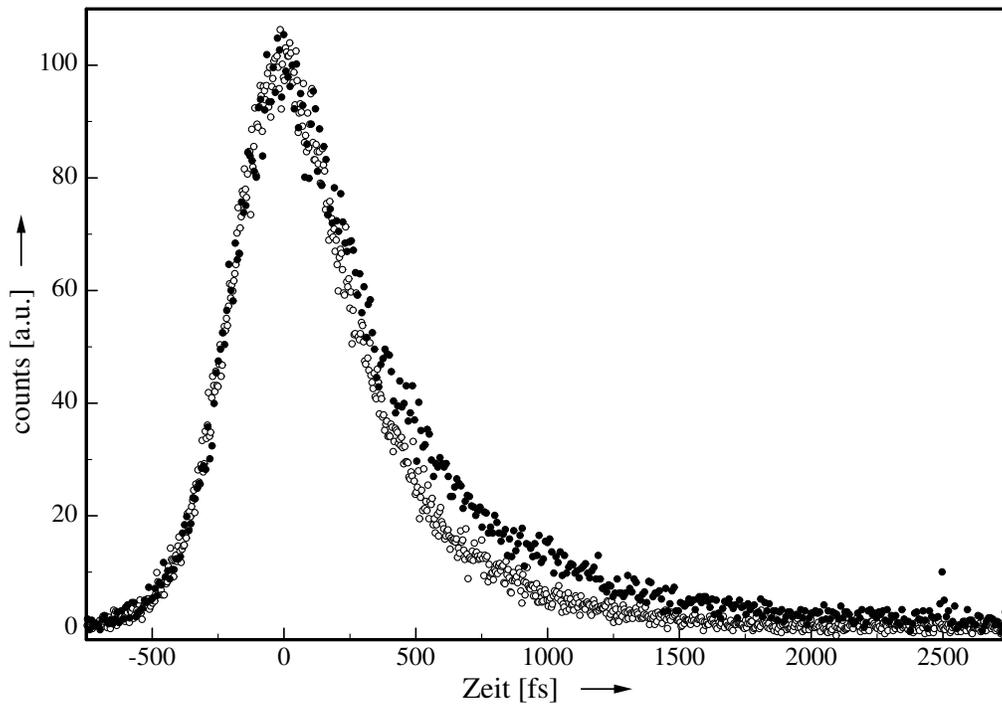


Abb. 4.8: S₂-Fluoreszenzlebensdauern von Malachitgrün bei unterschiedlichen Viskositäten 1 mPa·s (○) und 20 mPa·s (●) der Lösungsmittel Ethanol und Ethanol/Glykol

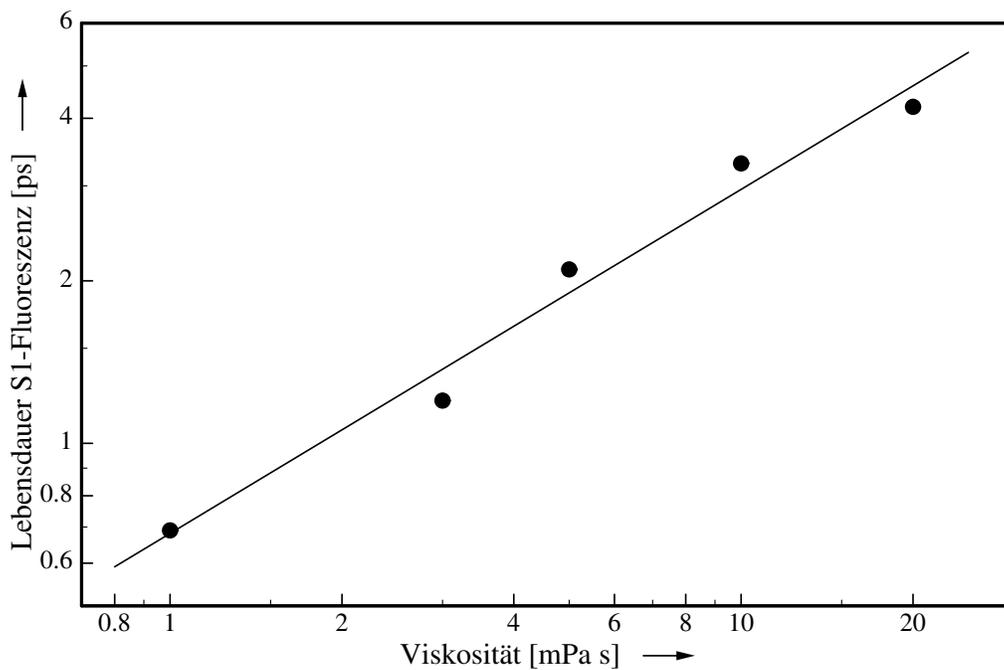


Abb. 4.9: S₁-Fluoreszenzlebensdauern von Malachitgrün bei unterschiedlichen Viskositäten in doppelt logarithmischer Darstellung mit eingezeichneter Ausgleichsgerade

4.4 Feste Proben

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels werden die Meßergebnisse an Malachitgrünproben, die in fester Form präpariert sind, vorgestellt. Dazu wird deren Herstellung beschrieben und Meßergebnisse von an Titandioxid (TiO_2) gebundenem bzw. kristallinem Malachitgrün gezeigt. Aus Arbeiten von Ramakrishna et al. [78, 77, 79] und Rehm et al. [83] ist bekannt, daß es aufgrund der energetisch günstigen Bandlücke von TiO_2 zu einem photoinduzierten Elektronentransfer zwischen dem Farbstoff und dem Trägermaterial kommen kann. An den Proben wird untersucht, ob eine Veränderung der Lebensdauer festzustellen ist.

4.4.1 Malachitgrün an Titandioxid

Zur Herstellung der Proben wird ein Verfahren angewendet, welches von Grätzel et al. [49, 9, 55] vorgestellt wurde. Zuerst wird eine Emulsion aus dem Titandioxid-Pulver „P25“ der DEGUSSA AG und „TritionTM X-100“ hergestellt. Der Farbstoff wird mit Ethanol in eine gesättigte Lösung gebracht und mit der Emulsion vermischt. Das Gemenge wird auf ein Deckglas aufgetragen und bei einer Temperatur von 700 K für ca. 20 Minuten im Ofen gesintert. Dieser Vorgang ist notwendig, um einen guten Kontakt zwischen dem Farbstoff und dem Trägermaterial herzustellen. Die so präparierte Probe wird wie in Kapitel 2.6 beschrieben mit Immersionsöl an das Mikroskopobjektiv angekoppelt. Da die Probe sehr leicht ausbleicht, muß eine geringe Bestrahlungstärke eingestellt werden. Außerdem ist es sinnvoll, die Probenstelle vor der Messung unter einem Lichtmikroskop genau zu untersuchen, um dadurch eine geeignete homogene Probenfläche für die Lebensdauermessung auszuwählen. Durch Verschieben der Probe vor dem Mikroskopobjektiv während der Messung kann das Ausbleichen des Farbstoffs minimiert werden. Dies ist erfahrungsgemäß nicht einfach zu realisieren, da es aufwendig ist das Objekt parallel vor dem Mikroskopobjektiv zu verschieben ohne den Immersionsölfilm abreißen zu lassen.

Zur Überprüfung der Intensitätsabnahme durch das Ausbleichen wird mehrfach und in beiden Bewegungsrichtungen der *Delay*strecke gemessen. Es zeigt sich, daß bei niedrigen Anregungsintensitäten ein Ausbleichen nur in sehr geringem Maße auftritt. Die in Abbildung 4.10 dargestellte Kurve zeigt eine Lebensdauermessung der S_2 -Fluoreszenz von an Titandioxid adsorbiertem Malachitgrün. Daß Signal verläuft symmetrisch zum Maximum. Auch wenn beim Abklingen eine zusätzliche Zeitkomponente festzustellen ist, kann der Signalverlauf nicht weiter ausgewertet werden, da dieser der Apparatfunktion des Systems, die aus der Rückfaltung der S_2 -Daten gewonnenen wurde, nahezu entspricht. Die Zeitauflösung des Meßsystems ist damit nicht ausreichend, um eine genauere Analyse der Daten vorzunehmen. Es läßt sich aber abschätzen, daß die Lebensdauer für die an Titandioxid adsorbierte Probe in der Größenordnung der Zeitauflösung des Aufbaus liegt.

Wie Rehm et al. [83] mit Coumarin 343, an Titandioxid adsorbiert, gezeigt haben, sind durch Elektroneninjektion die Lebensdauern bei adsorbierten Farbstoffen viel kürzer als die der in Lösung befindlichen. Aufgrund der starken Kopplung zwischen dem Farbstoff und dem Titandioxid werden Abklingdauern von weniger als 200 fs erreicht.

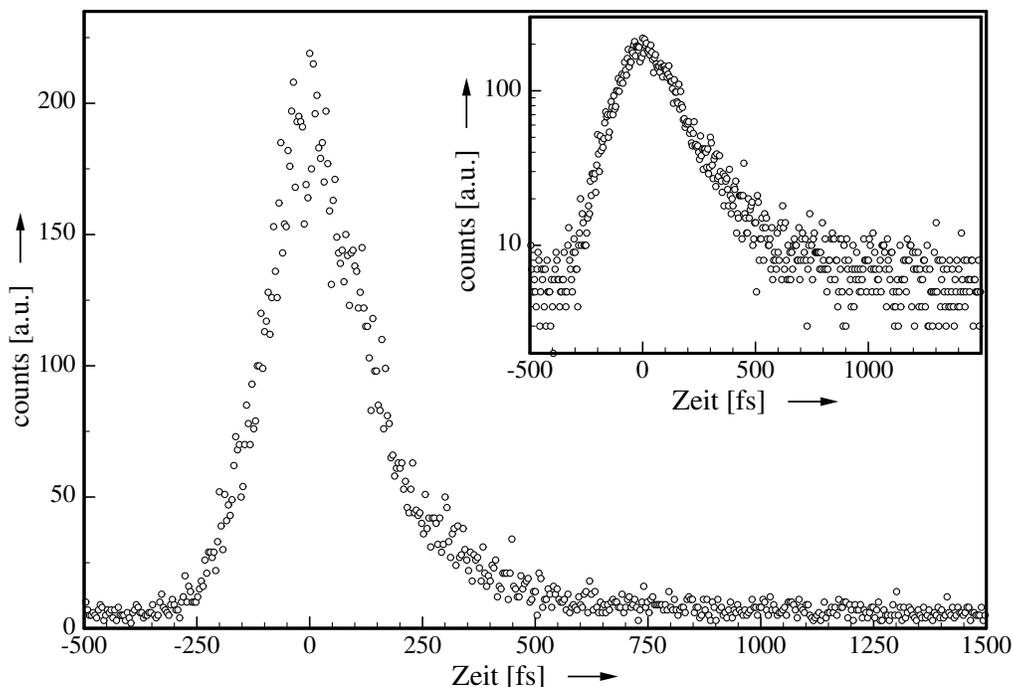


Abb. 4.10: Lebensdauerermessung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün, das an das Trägermaterial Titandioxid adsorbiert wurde.

Die Versuche, auch die Lebensdauern für die S_1 -Fluoreszenz von Malachitgrün an Titandioxid zu messen, haben kein bzw. nur ein sehr verrauschtes und nicht auswertbares Ergebnis gebracht. Daraus läßt sich ableiten, daß der Elektronentransfer in das Titandioxid direkt aus dem angeregten S_2 -Niveau stattfindet und die Möglichkeit eines Energietransfers in Form einer inneren Umwandlung (siehe 4.1) in Richtung des angeregten S_1 -Niveaus verhindert wird.

4.4.2 Malachitgrün in kristalliner Form

Die zweite Präparationsform der hier vorgestellten festen Proben wird durch Kristallisation des Farbstoffs Malachitgrün erzielt. Dazu wird eine gesättigte Lösung in eine rückstandsfreie und polierte Petrischale gegeben. Während des Eindampfens kristallisiert die Lösung aus und kann als feste Probe entnommen werden. Es zeigt sich, daß an diesen kristallinen Strukturen sehr gut Messungen vorgenommen werden können, da sie eine hohe Photostabilität besitzen. In Abbildung 4.11 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche einer kristallinen Probe dargestellt, die am „Institut für Reine und Angewandte Chemie“ der Universität Oldenburg aufgenommen wurden. Deutlich sind unregelmäßig angeordnete Strukturen in Form von Nadeln mit einer durchschnittlichen Länge von $300\ \mu\text{m}$ und Breite von $20\ \mu\text{m}$ zu erkennen.

Die kristalline Probe wird, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, auf der Rückseite eines Deckglases präpariert. Genau wie bei den Messungen an Titandioxid wird das Deckglas mit Immersionsöl an das Mikroskopobjektiv gekoppelt. Dabei ist es sinnvoll, die Stärke des Deckglases so zu bemessen, daß der Fokus in der Probenoberfläche liegt.

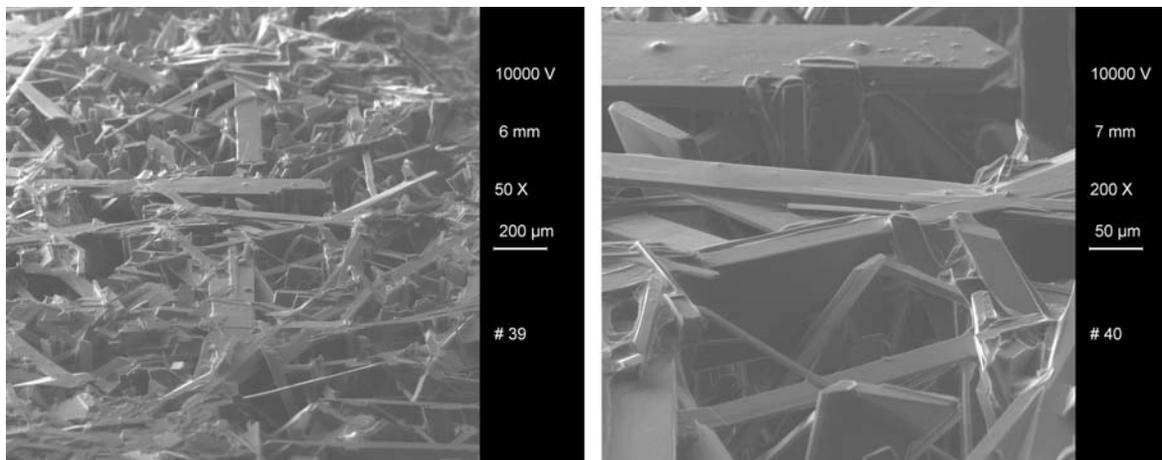
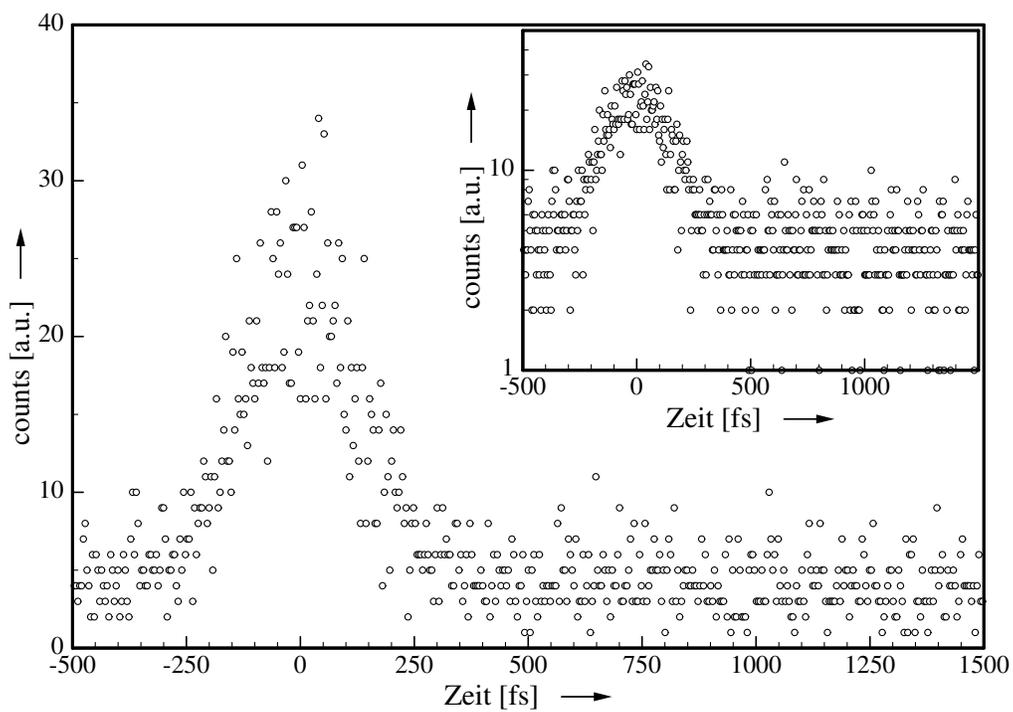
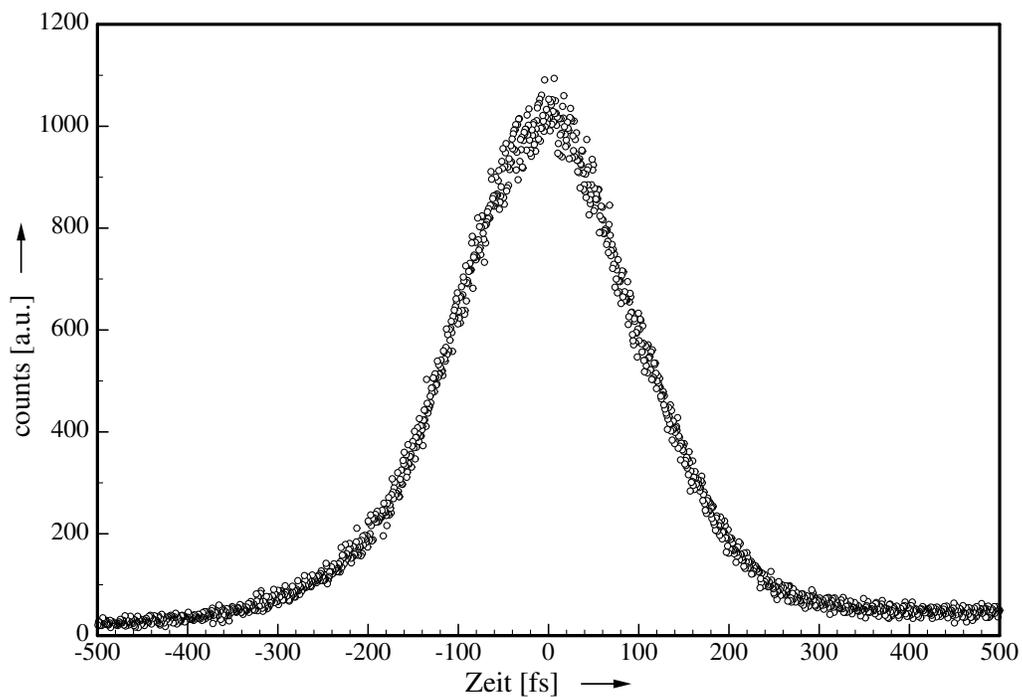


Abb. 4.11: Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme der Oberfläche von kristallinem Malachitgrün

In Abbildung 4.12 ist gut zu erkennen, daß die Fluoreszenzintensität bei der Bestimmung der S_2 -Lebensdauer vergleichsweise gering ist. Daraus läßt sich schließen, daß die Wahrscheinlichkeit der inneren Umwandlung in Richtung des angeregten S_1 -Niveaus gegenüber der Emission eines Photons aus dem S_2 -Niveau im Vergleich zu den gelösten Proben zunimmt, d.h. ein strahlungsloser Übergang wird durch die kristalline Struktur des Materials bevorzugt. Die damit verbundene Zunahme der Fluoreszenz aus dem S_1 -Zustand unterstützt diese Annahme. Wie Abbildung 4.13 zeigt, verkürzt sich die Lebensdauer der S_1 -Fluoreszenz des kristallinen Malachitgrün so stark, daß diese mit der durch das Meßsystem vorgegebenen Zeitauflösung nicht mehr genau vermessen werden kann und in einem Bereich unterhalb von 200 fs liegt.

Aus den Lebensdauerermessungen an festen Proben kann man als Ergebnis festhalten, daß die Annahme zur Verkürzung der Lebensdauern gegenüber den gelösten Proben bestätigt wird. Eine genaue Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauern ist aufgrund der Zeitauflösung des UPC-Meßsystems nicht möglich. Es zeigt sich aber, daß gerade diese festen Proben für den Gewinn einer Apparatefunktion bzw. für die Bestätigung der bisher gemessenen sehr gut geeignet sind.

Abb. 4.12: Messung der S_2 -Fluoreszenz an kristallinem MalachitgrünAbb. 4.13: Messung der S_1 -Fluoreszenz an kristallinem Malachitgrün

Kapitel 5

Möglichkeiten zur Entfaltung kurzer Signale

Wie bei vielen anderen Meßsystemen wird auch bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Zwei-Photonen-angeregten UPC-Verfahren eine Apparatfunktion benötigt, wenn ultrakurze Fluoreszenzlebensdauern genau bestimmt werden sollen [44]. Die Apparatfunktion soll alle Eigenschaften des Meß- und Detektionssystems erfassen, so daß ihre Bestimmung am Meßaufbau ohne zusätzliche Veränderungen vorgenommen wird. Die Entfaltung der gemessenen Werte mit dieser Funktion liefert dann das eigentliche Fluoreszenzlebensdauersignal.

Bei der Anwendung der UPC-Methode, in der das Zeitverhalten der Fluoreszenz einer Probe mittels eines Referenzpulses abgetastet wird, hängt die Zeitauflösung des Systems maßgeblich von der Breite des abtastenden Referenzsignals ab. Zusätzlich wird der zeitliche Signalverlauf durch die Dispersion der optischen Elemente verschmiert (*Chirp*). Besonders durch das Mikroskopobjektiv kommt es zu einer Verbreiterung der Anregungspulse. Untersuchungen dazu wurden von Fujino et al. [38] für Mikroskopobjektive mit verschiedenen numerischen Aperturen durchgeführt. Durch die Zwei-Photonen-Anregung der Probe wird die zeitliche Verbreiterung wieder etwas kompensiert, da diese im Vergleich zur Ein-Photon-Anregung eine kürzere Signaldauer (Halbwertsbreite) besitzt. Bei einem angenommenen sech^2 -förmigen Signalverlauf der Anregungspulse steht aufgrund der Zwei-Photonen-Anregung ein um etwa ein Drittel kürzeres Anregungssignal als bei der Ein-Photon-Anregung zur Verfügung.

Messungen in diesem Kapitel zeigen, daß die NIR-Pulse ungefähr eine Halbwertsbreite von 115 fs vor dem Durchlaufen des Mikroskopobjektivs besitzen. Aus der zuvor aufgestellten Annahme ergibt sich eine Halbwertsbreite von 75 fs für die Zwei-Photonen-Anregung.

Sehr genaue Ergebnisse bei der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer lassen sich dadurch erzielen, daß man sowohl das Fluoreszenzsignal als auch die Erzeugende vermißt, um durch Entfaltung den funktionalen Zusammenhang zwischen beiden herzustellen. In Kapitel 3.4.2 wurde dies am Beispiel der S_1 - und S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün gezeigt. Da das Lebensdauersignal der S_2 -Fluoreszenz den zeitlichen Verlauf der Erzeugenden der S_1 -Fluoreszenz beschreibt, liefert die Entfaltung einen sehr genauen Wert der S_1 -Fluoreszenzlebensdauer. Für den Fall, daß die Erzeugende nicht direkt gemessen

werden kann, ist in Kapitel 3.4.3 eine Möglichkeit dargestellt, die Apparatefunktion aus einer Fluoreszenzlebensdauermessung durch Rückfaltung zu bestimmen.

In diesem Kapitel werden weitere Möglichkeiten zur Bestimmung einer Apparatefunktion diskutiert. Zuerst wird eine Methode aufgezeigt, mit der sich eine Erzeugende direkt aus dem gemessenen Signal ableiten läßt. Anschließend werden Ergebnisse der Korrelationsmessungen aufgeführt und deren Verwendung als Apparatefunktion diskutiert.

5.1 Apparatefunktion aus der Spiegelung des Signalanstiegs

Bei Signalen mit relativ kurzer Fluoreszenzlebensdauer kann es ausreichen, eine Apparatefunktion aus der Spiegelung des Anstiegs der Fluoreszenzabklinkkurve zu gewinnen, da die Anregung im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer als δ -förmig betrachtet werden kann. Diese Methode wird eingesetzt, um mit wenig Aufwand eine Apparatefunktion zu bestimmen, wobei die Erfassung des Signalanstiegs mit großer Genauigkeit erfolgen muß. Werden z.B. die in Kapitel 4.2.2 vorgestellten Daten mit einer Apparatefunktion aus der Spiegelung der Anstiegsflanke entfaltet, ergibt sich für die Fluoreszenz von Malachitgrün im Lösungsmittel Wasser eine S_2 -Lebensdauer von $223 \text{ fs} \pm 32 \text{ fs}$ und eine S_1 -Lebensdauer von $584 \text{ fs} \pm 39 \text{ fs}$. Diese Methode funktioniert zwar bei den meisten Messungen recht gut, zeigt jedoch gerade für die Bestimmung kurzer Lebensdauern abweichende und tendenziell kleinere Werte.

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich bei vergleichsweise sehr langen Fluoreszenzlebensdauern, da dort das Maximum der Kurve immer breiter wird und die Position der Symmetrieachse sich nur mit zunehmender Ungenauigkeit festlegen läßt. Daher eignet sich diese Methode nur bedingt zur Ermittlung einer Apparatefunktion und liefert allenfalls eine Möglichkeit zur schnellen Abschätzung.

5.2 Autokorrelation an Luft

Eine andere Methode zur Messung einer Apparatefunktion ist die Bestimmung der Autokorrelation innerhalb des Meßaufbaus. Dazu muß die Strahlführung des Detektionssignals so angepaßt werden, daß die NIR-Pulse am Kristall zur Frequenzmischung zur Verfügung stehen.

In dem in Abschnitt 3.5 vorgestellten Transmissionsaufbau läßt sich die Strahlführung sehr gut anpassen, da nur die Probe (SA_T) aus dem Strahlengang entfernt und die Abbildung des Fokuspunktes durch die Linse (L_2) angepaßt werden muß.

In der konfokalen Reflexionsanordnung, die in Kapitel 2.3 beschrieben ist, wird die Probe (SA) durch einen Planspiegel ersetzt. Da der dichroitische Spiegel (DM) im Wellenlängenbereich der NIR-Pulse keine Transmission erlaubt, muß dieser gegen eine dünne Strahlteilerfolie getauscht werden.

Eine direkte interferometrische Autokorrelation, wie sie der Autokorrelator mißt, kann in beiden Versuchsaufbauten nicht bestimmt werden, da es keine kollineare Einstrahlung in den Mischkristall gibt. Vielmehr muß der Kristall so gedreht werden, daß die

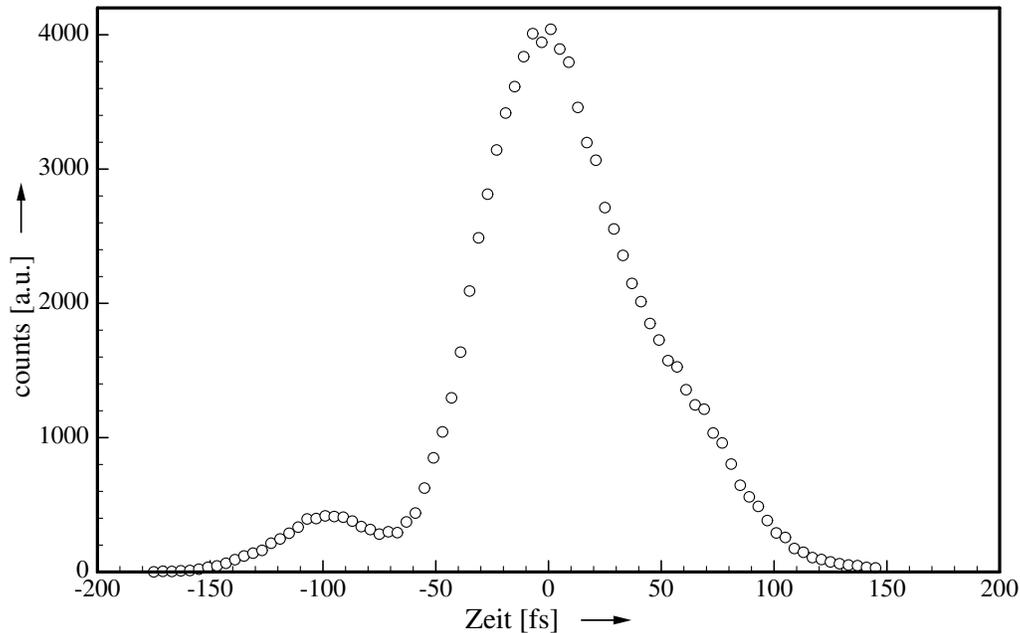


Abb. 5.1: Messung der Autokorrelation an Luft in einem konfokalen Reflexionsaufbau bei einer Wellenlänge von 800 nm

Anteile aus beiden einfallenden Signalen gleichmäßig für den Mischprozeß zur Verfügung stehen. Autokorrelationsmessungen konnten aufgrund der Schnittwinkel der zur Verfügung stehenden Mischkristalle nur bei einer Wellenlänge von 800 nm durchgeführt werden. In Abbildung 5.1 ist die Autokorrelationsspur, die in dem konfokalen Reflexionsaufbau gemessen wurde, dargestellt. Die Autokorrelationsspuren in Transmissionsmessung zeigen einen ähnlichen Verlauf und sind daher nicht weiter aufgeführt. Wie deutlich zu erkennen ist, ergibt sich keine glatte symmetrische Kurve, sondern eine Aufspaltung in zwei unterschiedlich starke Signale. Dieser als *Pulse Splitting* bezeichnete Effekt kann in nichtlinearen dispersiven Medien auftreten. Untersuchungen dazu sind u.a. von Ranka et al. [80] und Trippenbach et al. [102, 103] veröffentlicht worden. Um genauere Informationen des Signalverlaufs zu bekommen, werden im nächsten Abschnitt Ergebnisse von Messungen gezeigt, in denen die Intensität in Abhängigkeit von der Zeit und der Wellenlänge bestimmt wurde.

5.3 Zeit- und Wellenlängenspektrum der Autokorrelation

Zur gleichzeitigen Bestimmung des Zeit- und Wellenlängenspektrums der Laserpulse wird die Detektionseinheit, d.h. der Interferenzfilter (IF) und der Photomultiplier (PMT), durch ein Spektrometer „PC2000“ der Firma OCEAN OPTICS [73] ersetzt. Dieses besitzt zwar eine wesentlich geringere, aber bei der vergleichsweise hohen Intensität des Mischsignals ausreichende Empfindlichkeit. Für eine eingestellte Position des *Delays* wird jeweils ein Wellenlängenspektrum aufgenommen. Anschließend werden

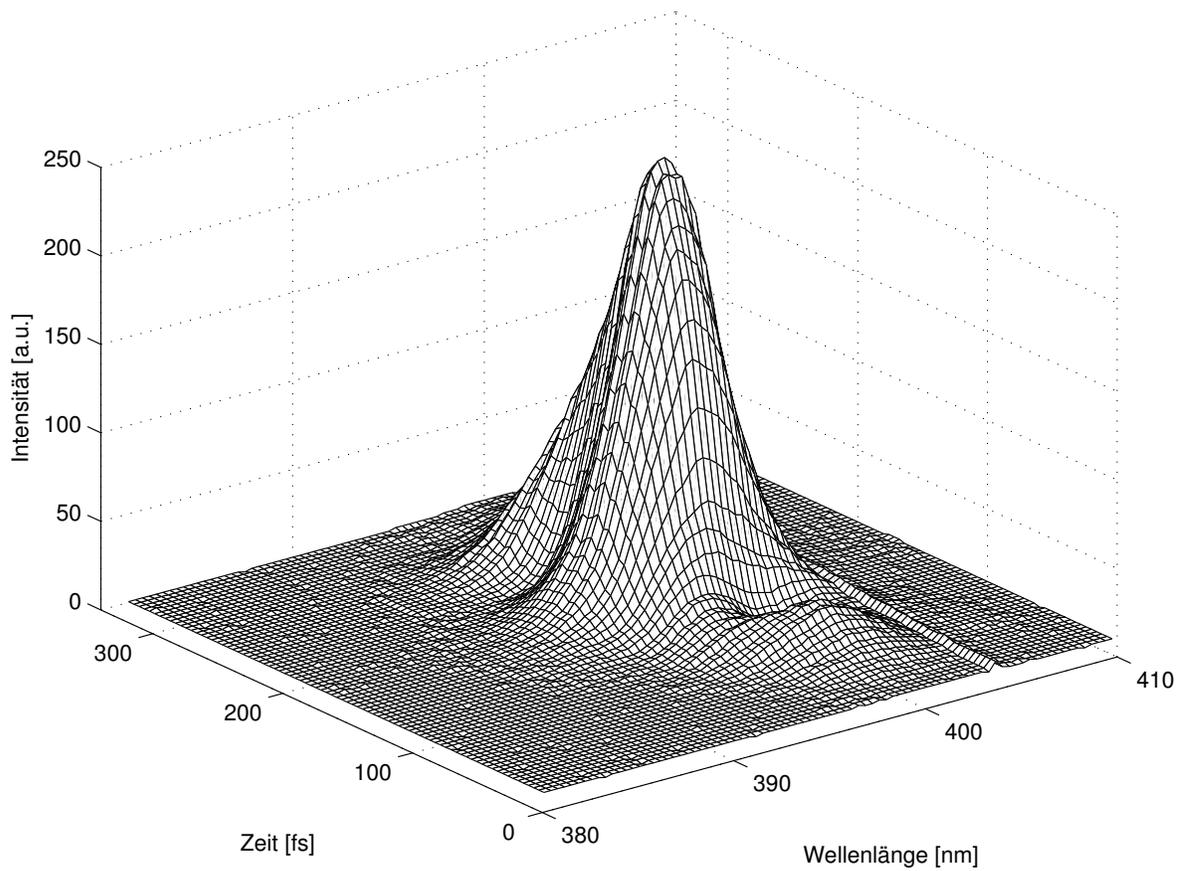


Abb. 5.2: Signalintensität der Autokorrelation bei 800 nm in der konfokalen Reflexionsanordnung über der Zeit und der Wellenlänge gemessen.

diese Einzelspektren wie in Abbildung 5.2 gezeigt zu einer dreidimensionalen Darstellung zusammengefügt und als zeitliche Änderung dargestellt. Analog zu Kapitel 5.2 wurde die Messung bei einer Laserwellenlänge von 800 nm durchgeführt. Auch hier ist eine deutliche Aufspaltung des Signales zu erkennen, da der Effekt des *Pulse Splitting* sich im Mischprozeß auswirkt.

Die Ergebnisse dieses und des vorangegangenen Abschnitts zeigen, daß die Autokorrelationskurve nicht sonderlich gut als Apparatefunktion geeignet ist, sich aber zur Abschätzung einer Halbwertsbreite des Anregungssignals von 100 fs verwenden läßt.

5.4 Apparatefunktion aus der Kreuzkorrelation

Eine sehr häufig genutzte Möglichkeit zur Bestimmung einer Apparatefunktion ist die Messung der Kreuzkorrelation. Dabei werden sowohl in der Transmissions- (Kapitel 3.5, Seite 40) als auch in der Reflexionsanordnung (Kapitel 2.3, Seite 11) die Proben durch einen Kristall ersetzt, der die zweite Harmonische des Detektionssignals erzeugt. In den

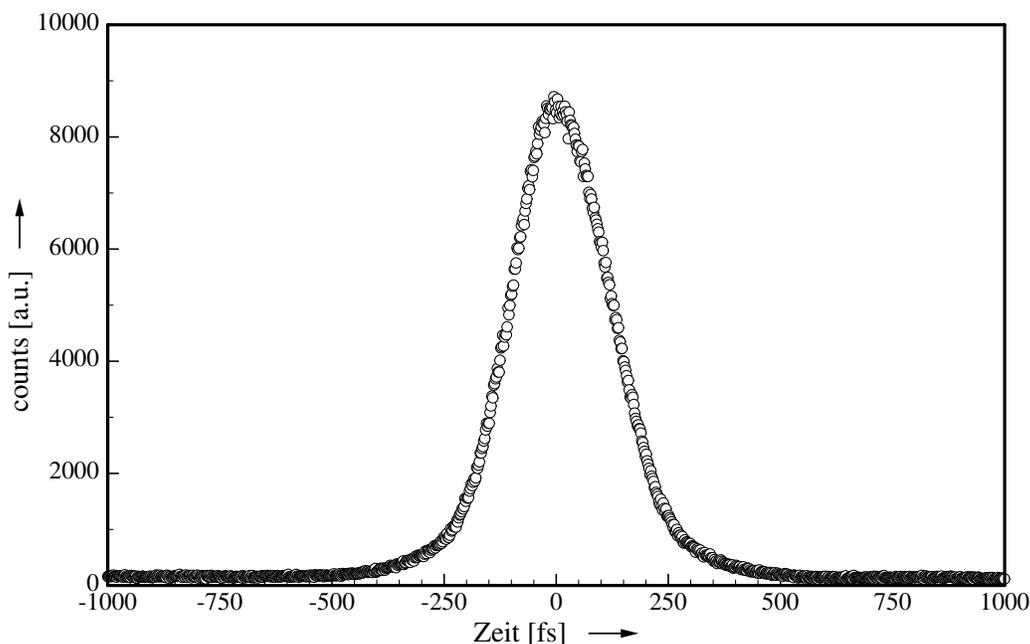


Abb. 5.3: Kreuzkorrelation, gemessen bei einer Laserwellenlänge von 830 nm im Aufbau der konfokalen Reflexionsmessung

Aufbauten ist dazu ein entsprechend geschnittener BBO-Kristall mit einer Stärke von $500\mu\text{m}$ eingebaut worden. Die so erzeugten SHG-Laserpulse werden im Kristall (CR) mit dem NIR-Laserpuls gemischt und durch die Längenänderung des *Delays* abgetastet.

Da der Arbeitsabstand des Mikroskopobjektivs (MO) so gering ist, daß der Kristall direkten Kontakt haben muß, sind Reflexionsmessungen nur bei einer Anregungswellenlänge von 830 nm vorgenommen worden. Die für andere Wellenlängen notwendigen Phasenadjustierungen können aufgrund der geringen Abstände nicht durch Drehen dieses

SHG-Kristalls, sondern nur durch entsprechend geschnittene andere Kristalle erreicht werden. Zu beachten ist, daß sich bei dieser konfokalen Anordnung das SHG-Signal zunächst nur in die gleiche Richtung ausbreitet wie der einfallende Strahl und erst durch Reflexion an der Rückseite des SHG-Kristalls in die richtige Richtung umgelenkt wird. Dementsprechend muß der Fokus des Laserpulses möglichst nahe an der Rückseite des

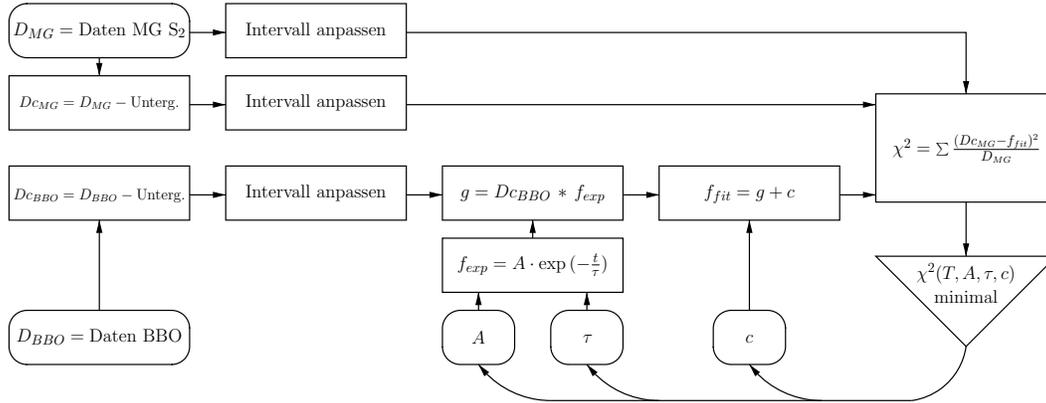


Abb. 5.4: Ablaufdiagramm zur Entfaltung der Daten der S₂-Malachitgrün-Messung (MG S₂) mit Daten der Kreuzkorrelation (BBO)

Kristalls liegen. Kohärenzeffekte zwischen *Delay*- und Probenstrahl bzw. *Pulse Splitting* im Mischkristall werden nicht beobachtet.

Für den Mischprozeß muß die Polarisationssebene der zweiten Harmonischen vertikal gedreht werden. Dazu wird eine $\frac{\lambda}{2}$ -Platte zwischen den dichroitischen Spiegel (DM) und die Linse (L₁) in den Strahlengang gestellt.

Das in Abbildung 5.3 dargestellte Kreuzkorrelationssignal verläuft sehr symmetrisch um das Maximum und besitzt eine Halbwertsbreite von 250 fs. Die Daten der Kreuzkorrelation lassen sich direkt als Apparatefunktion zur Entfaltung verwenden. Abbildung 5.4 zeigt ein Ablaufdiagramm für die Entfaltung der S₂-Malachitgrün-Daten (MG S₂) mit den Messwerten aus der Kreuzkorrelation (BBO). Zuerst wird der konstante Untergrund von den Messwerten subtrahiert und anschließend das Anpassungsintervall ausgewählt. Die in der Kreuzkorrelation gemessenen Werte werden mit einer monoexponentiellen Funktion gefaltet, bevor über die Summe der kleinsten Abstandsquadrate die Abweichung von den Meßwerten der S₂-Daten bestimmt wird. Die Parameter der Exponentialfunktion werden so lange variiert, bis die Abweichung zwischen der errechneten und der gemessenen Funktion minimal ist. Wie in Abbildung 5.5 zu sehen ist, wird mit dieser Apparatefunktion, d.h. den Meßdaten der Kreuzkorrelation, eine signifikante Anpassung erreicht. Nur in den Randbereichen der Meßkurve sind geringe Abweichungen zu sehen. Bei einer Schrittweite von 4 fs ergibt sich eine Lebensdauer der S₂-Fluoreszenz τ_{S_2} von $253 \text{ fs} \pm 43 \text{ fs}$ bei einem χ^2_{red} von 1,2.

Eine Möglichkeit, den Signalverlauf der Kreuzkorrelation zu interpretieren, wird im Folgenden vorgestellt. Davon ausgehend, daß die Einhüllende der ausgekoppelten Laserpulse dem zeitlichen Verlauf des sech^2 folgt [31, 85], gilt die in Gleichung (5.1)

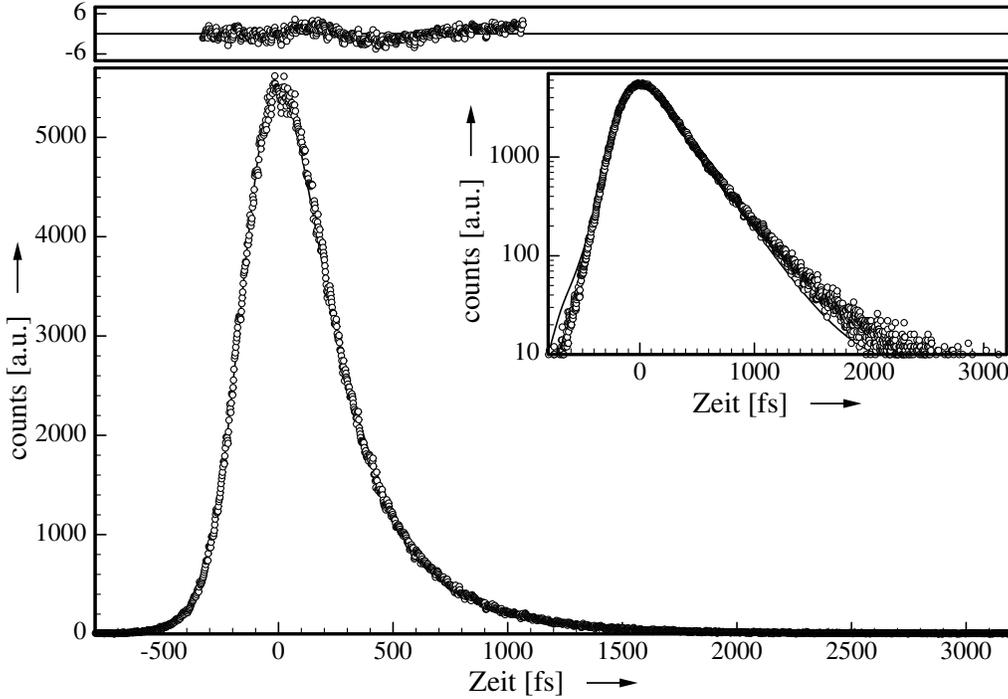


Abb. 5.5: Meßwerte der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün (\circ) im Lösungsmittel Wasser und die aus der Faltung der Kreuzkorrelationsdaten mit einer monoexponentiellen Funktion ($\tau_{S_2} = 253$ fs) berechnete Fitkurve (—)

dargestellte Proportionalität.

$$I(t) \propto \text{sech}^2 \left[\frac{t}{\tau_s} \right] \quad (5.1)$$

Die Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) bewirkt eine Quadrierung des Intensitätssignals. Zusätzlich findet in dem Mischkristall eine Faltung (\otimes) zwischen dem SHG- und dem über die *Delay*-Strecke laufenden Signal statt.

$$I_{\text{meas}}(t) \approx \underbrace{I(t)^2}_{(\text{SHG})} \otimes \underbrace{I(t)}_{(\text{Delay})} \quad (5.2)$$

Durch Variation von τ_s , das als freier Parameter in $I(t)$ eingeht, kann die in Gleichung (5.2) definierte Faltungsfunktion auf die Meßwerte I_{meas} angepaßt werden. In Abbildung 5.6 sind die aus der Kreuzkorrelation gemessenen Werte (\circ) und die nach Gleichung (5.2) berechnete Funktion I_{meas} (—) dargestellt. Es ergibt sich, daß mit den einfachen Annahmen aus Gleichung (5.1) und (5.2) der gemessene Signalverlauf der Kreuzkorrelation sehr gut beschrieben werden kann. Zwar gibt es im Maximum der Kurven leichte Abweichungen, jedoch stimmen die Signalverläufe auffallend gut überein. Die Berechnungen ergeben für τ_s einen Wert von $115 \text{ fs} \pm 12 \text{ fs}$ bei einem χ^2_{red} von 1,3.

$$I_{S_2}(t) \approx I(t)^2 \otimes \exp \left(-\frac{t}{\tau_{S_2}} \right) \otimes I(t) \quad (5.3)$$

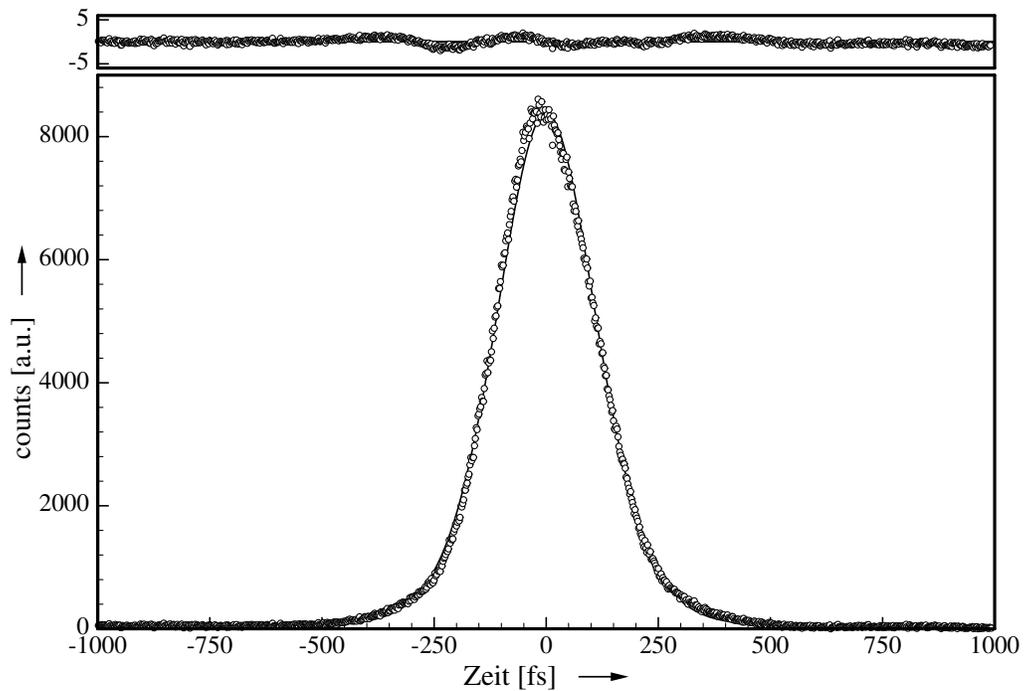


Abb. 5.6: Messwerte der Kreuzkorrelation bei 830 nm (\circ) in der Reflexionsanordnung und aus dem angenommenen Signalverlauf berechnete Kurve ($-$)

Mit der so berechneten Apparatefunktion wird exemplarisch die Lebensdauer der S_2 -Fluoreszenz des in Wasser gelösten Farbstoffs Malachitgrün nach Gleichung (5.3) bestimmt.

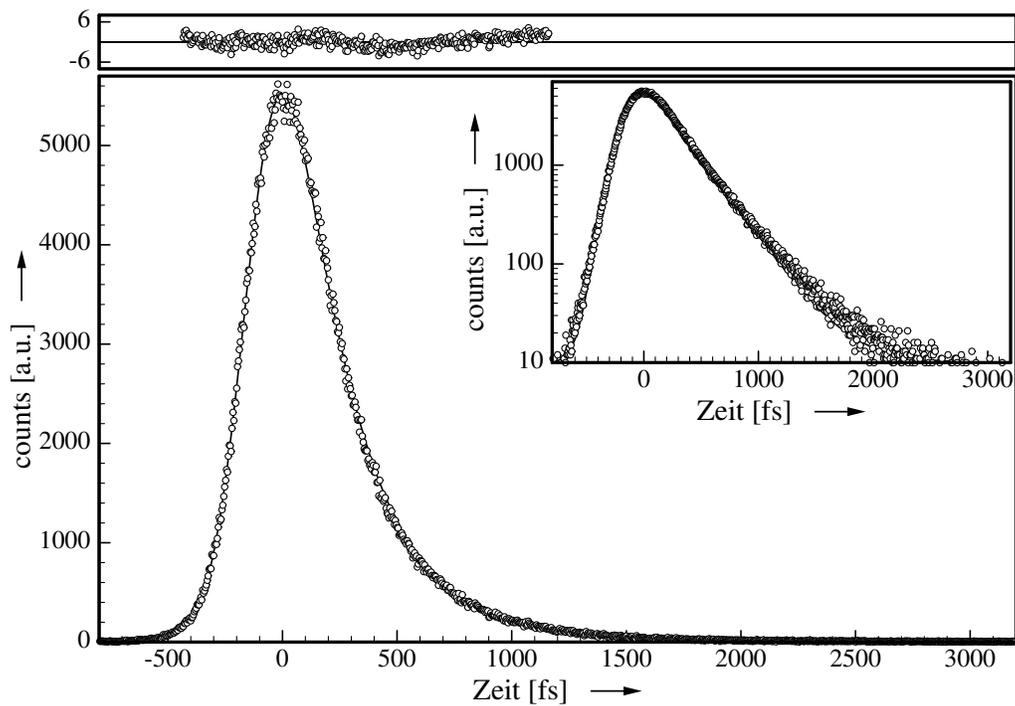


Abb. 5.7: Meßwerte der S₂-Fluoreszenz von Malachitgrün (○) im Lösungsmittel Wasser und die aus dem angenommenen Signalverlauf und der Faltung mit einer monoexponentiellen Funktion ($\tau_{S_2} = 265$ fs) berechnete Fitkurve (—)

Bei den in Abbildung 5.7 dargestellten Ergebnissen liegt die Schrittweite bei 4 fs und es errechnet sich eine Lebensdauer von $\tau_{S_2} = 265 \text{ fs} \pm 36 \text{ fs}$ mit einem τ_s des Anregungspulses von 115 fs bei einem χ^2_{red} von 1,1.

Offensichtlich bringt eine Analyse der Kreuzkorrelation mit einem theoretischen Ansatz für den Signalverlauf der Laserpulse eine „bessere“ Apparatfunktion zur Auswertung der Meßdaten.

Kapitel 6

Untersuchung weiterer Farbstoffe

Um die Übertragbarkeit der Meßmethode (siehe Kapitel 2.7) auf andere Farbstoffe zu überprüfen, werden im Folgenden neben dem bereits untersuchten Farbstoff Malachitgrün auch andere Laserfarbstoffe mit dem UPC-System vermessen. Dabei handelt es sich um ausgewählte Beispiele der Triphenylmethanfarbstoffe und die speziellen Farbstoffe DASPI, Cumarin und POPOP.

6.1 Triphenylmethanfarbstoffe

Ein besonderes Interesse im Bereich der Farbstoffe gilt der Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe, die als gemeinsames Strukturmerkmal drei Phenylgruppen als Chromophor (siehe Abbildung 6.1 [a]) besitzen und daher sich auch in ihren spektralen Eigenschaften ähneln. Triphenylmethanfarbstoffe sind eine Gruppe von organischen Farbmitteln,

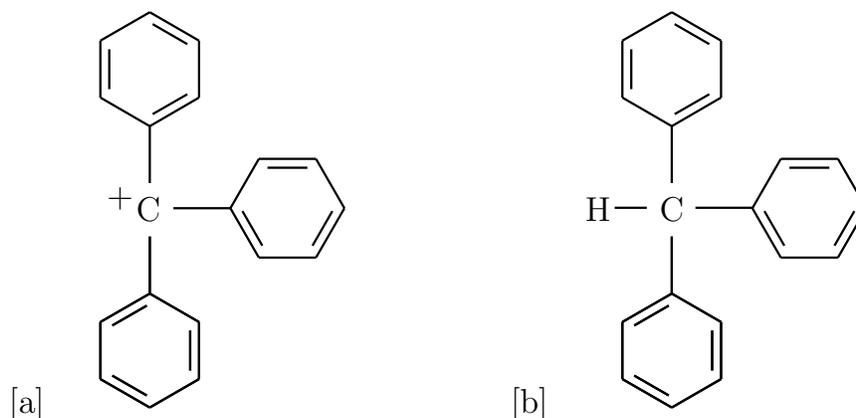


Abb. 6.1: Gemeinsames Strukturmerkmal und Chromophor der Triphenylmethanfarbstoffe [a] und Strukturformel des Triphenylmethan-Moleküls [b]

Die Phenylgruppen des Chromophors sind mit einer Reihe funktioneller Gruppen substituiert, wie z.B. die elektronenliefernden Auxochrome (NH_2 , NHR , NR_2 , OH und andere) und elektronenziehenden Antiauxochrome. Liegt eine Farbigeit des

Stoffes vor, sind mindestens zwei Phenylgruppen des Kations mit Auxochromen substituiert [108].

Am Beispiel der Resonanzstrukturen der kationischen Darstellung des Triphenylmethans (siehe Abbildung 6.2) wird deutlich, daß das π -Elektronensystem über alle drei Phenylgruppen und das zentrale Kohlenstoffatom delokalisiert vorliegt. Die Größe des

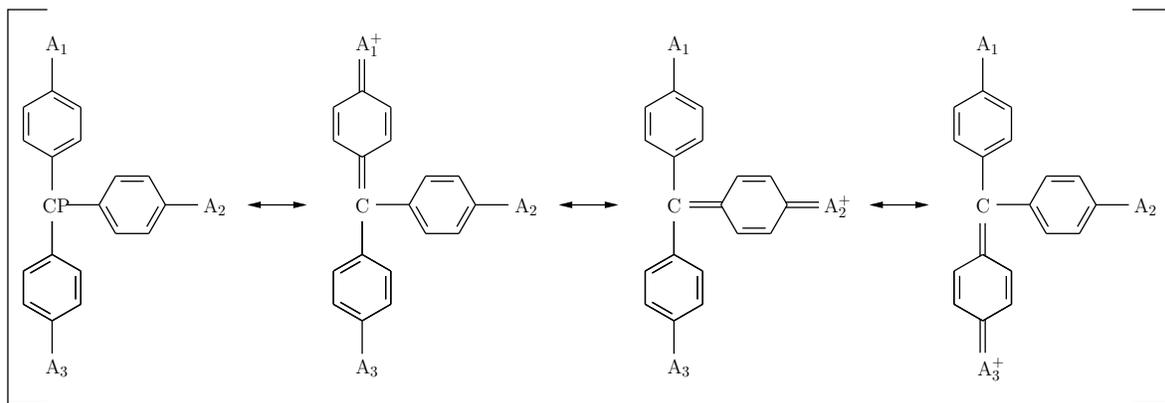


Abb. 6.2: Resonanzstrukturen eines mit Auxochromen (A_1 , A_2 , A_3) substituierten Triphenylmethanfarbstoffs

delokalisierten π -Elektronensystems hängt von der Art und Anzahl der substituierten Auxochrome oder Antiauxochrome ab. Sie beeinflussen die Größe des delokalisierten π -Elektronensystems, aus der die unterschiedliche Farberscheinung resultiert. Dabei kann es zu farbvertiefenden (bathochromen) Effekten, bei denen die Lichtabsorption von kürzeren zu längeren Wellenlängen hin verschoben wird, oder umgekehrt zu hypochromen Effekten kommen.

Triphenylmethan erscheint farblos, da den delokalisierten Elektronen keine über das vierfach substituierte Kohlenstoffatom hinwegführenden π -Elektronenwolken zur Verfügung stehen. Durch diese Unterbrechung sind die farbliefernden π -Elektronensysteme auf die einzelnen Phenylringe beschränkt, deren Anregungsenergie wesentlich höher ist als die Energie des sichtbaren Lichts.

Bei den zusätzlich zum Malachitgrün untersuchten Triphenylmethanfarbstoffen handelt es sich um Rhodulin Blau 6G, Kristallviolett und Brilliantgrün. Zur Vergleichbarkeit der Proben wird Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt.

6.1.1 Rhodulin Blau 6G

Rhodulin Blau 6G gehört, wie auch Malachitgrün zu den Diaminotriphenylmethan-Farbstoffen. Dieser kationische Farbstoff wird sehr häufig zum Einfärben von Tinte, Toner und Kugelschreiber-Farbe genutzt, da er unter anderem eine sehr gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und eine hohe Lichtechtheit besitzt. Seine Strukturfor-

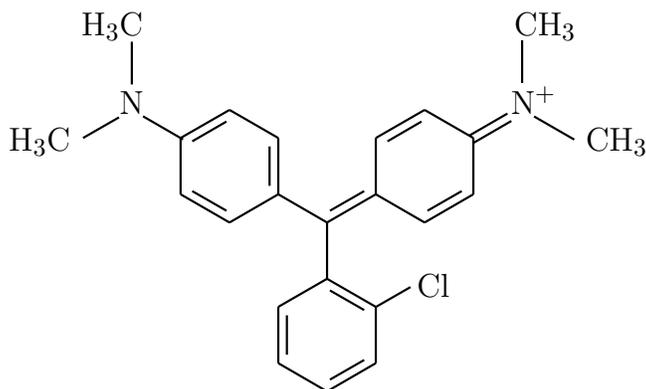


Abb. 6.3: Strukturformel des Farbstoffs Rhodulin Blau 6G

mel in Abbildung 6.3 ist mit der von Malachitgrün bis auf das zusätzliche Chlor-Atom am vorher unsubstituierten Phenylring identisch. Dieser Substituent ist für einen ba-

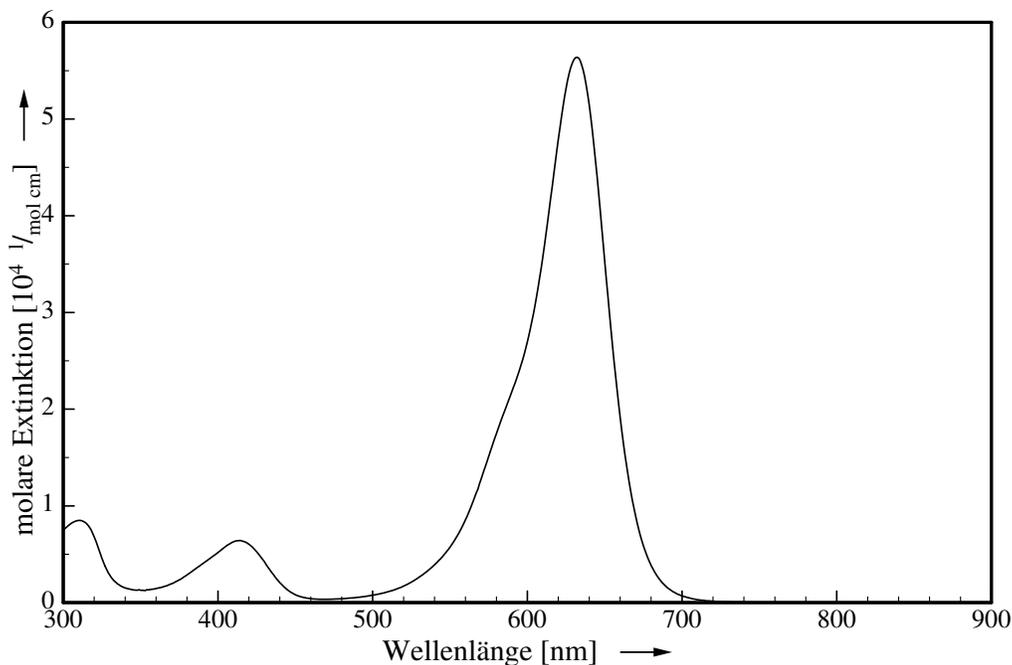


Abb. 6.4: Absorptionsspektrum von Rhodulin Blau 6G im Lösungsmittel Ethanol

thochromen Effekt verantwortlich. Auch läßt sich aus dem in Kapitel 4 vorgestellten Modell, in dem ein Zusammenhang zwischen der räumlichen Anordnung der Phenylringe und den Fluoreszenzlebensdauern beschrieben ist, schließen, daß eine längere

Lebensdauer für die S_1 - und S_2 -Fluoreszenz als bei Malachitgrün zu erwarten ist, da die Drehung aller drei Phenylringe durch Substituenten beeinflusst wird.

Das Absorptionsspektrum von Rhodulin Blau 6G in Abbildung 6.4 zeigt, daß bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit einer Laserwellenlänge von 830 nm der angeregte S_2 -Zustand des Moleküls erreicht wird. So lassen sich entsprechend der Lebensdauerermessung bei Malachitgrün auch hier die Abklingdauern für den S_2 - und den S_1 -Zustand bestimmen. Das Fluoreszenzspektrum selbst konnte nicht direkt vermessen werden, es hat sich aber bei den Messungen anhand der Signalintensität gezeigt, daß das S_2 -Fluoreszenzmaximum im Bereich von 480 nm und das S_1 -Fluoreszenzmaximum im Bereich von 670 nm liegt. Daher wird analog zu den Messungen an Malachitgrün zur Bestimmung der S_2 -Fluoreszenz ein Interferenzfilter der Wellenlänge 305 nm eingesetzt und für die S_1 -Messung eines der Wellenlänge 370 nm.

Zuerst wird die Lebensdauer der S_1 -Fluoreszenz dadurch ermittelt, daß die Meßkurve unter Auslassung der Anstiegsflanke und dem ersten (schnellen) Teil des Fluoreszenzabklingens durch einen monoexponentiellen Fit angenähert wird. Dadurch ist gewährleistet, daß das Füllen des S_1 -Niveaus nicht mehr durch die Relaxation aus dem S_2 -Zustand beeinflusst wird und somit direkt die Lebensdauer $\tau_{S_1} = 1578 \text{ fs} \pm 50 \text{ fs}$ gemessen werden kann.

In Abbildung 6.5 sind die so angepaßte Funktion und die Meßwerte dargestellt. Die

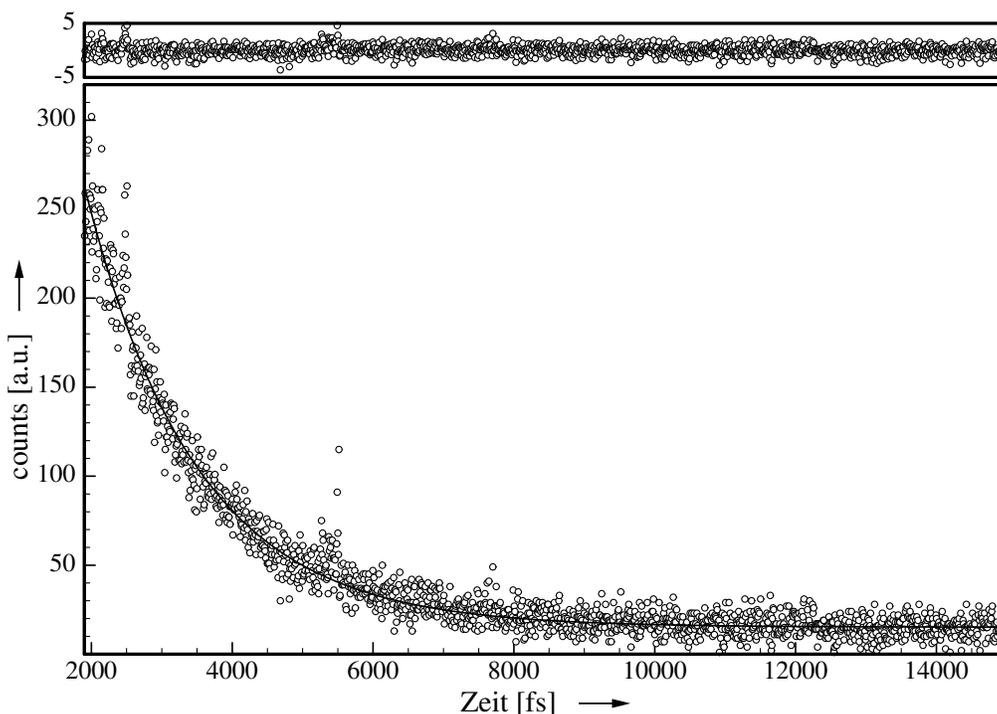


Abb. 6.5: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve zu den im Zeitfenster dargestellten Meßwerten

Anpassung findet im Zeitfenster von 2 ps bis 15 ps nach Erreichen des Maximums statt. Die Residuen zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung und für χ^2_{red} errechnet sich ein Wert von 1,0.

Eine weitere Möglichkeit für die Bestimmung der S_1 -Lebensdauer besteht darin, die aus der S_1 -Fluoreszenz gewonnenen Daten durch die entsprechende S_2 -Messung zu entfalten. Auch hier gilt, daß ein monoexponentieller Zusammenhang zwischen den beiden Lebensdauern existiert. Das Anpassen der Exponential-Funktion wird über die Minimierung des Fehlerquadrates durchgeführt. Die über den Fit erzeugte Funktion (–) zeigt eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Werten (o) bei einer Anpassung in einem Zeitfenster von 1 ps vor bis 6,2 ps nach Erreichen des Maximums, wie in Abbildung 6.6 dargestellt ist. Aus der Berechnung der Lebensdauer der S_1 -Fluoreszenz nach diesem Verfahren errechnet sich ein Wert $\tau_{S_1} = 1500 \text{ fs} \pm 65 \text{ fs}$ bei $\chi^2_{red} = 1,2$. In der

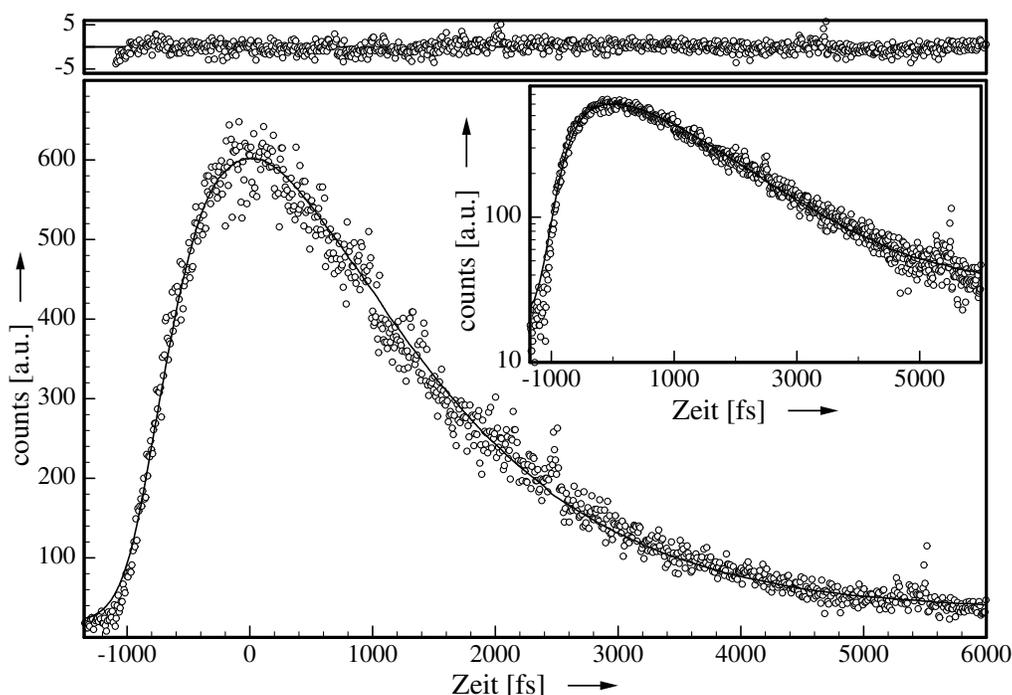


Abb. 6.6: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G und aus der Entfaltung mit den S_2 -Daten berechnete Fit-Kurve

halblogarithmischen Darstellung des Insets ist zu erkennen, daß die Anpassung auch im Bereich des Anstiegs mit den gemessenen Werten sehr gut übereinstimmt. Durch die gleichmäßige Verteilung der Residuen wird dies bestätigt.

Unter Zuhilfenahme der Apparatefunktion, die aus den Malachitgrün-Messungen gewonnen wurde, läßt sich auch die Lebensdauer der S_2 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G ermitteln. In Abbildung 6.7 sind die Meßwerte für die S_2 -Daten und die errechnete Funktion dargestellt. Die Anpassung wird in einem Zeitfenster von 400 fs vor bis 5,9 ps nach Erreichen des Maximums durchgeführt. Sowohl die lineare als auch die halb-logarithmische Darstellung zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen Daten und den durch den Fit errechneten Werten. Lediglich im Bereich des Maximums liegen die gemessenen Werte etwas höher. Die Lebensdauer des S_2 -Zustandes von Rhodulin Blau 6G beträgt hier $484 \text{ fs} \pm 85 \text{ fs}$. Die Anpassung ist zwar mit einem Fehler behaftet, läßt aber trotzdem einen Fit in fast dem gesamten Bereich zu. Dies wird auch

durch das ermittelte reduzierte Fehlerquadrat $\chi^2_{red} = 1,3$ bestätigt.

In einem nächsten Schritt lassen sich die ermittelten Größen für die Lebensdauern des S_2 - und S_1 -Zustandes verifizieren, indem die Meßwerte der S_1 -Fluoreszenz durch einen biexponentiellen Fit angepaßt werden. Dazu wird das Zeitfenster zwischen 600 fs

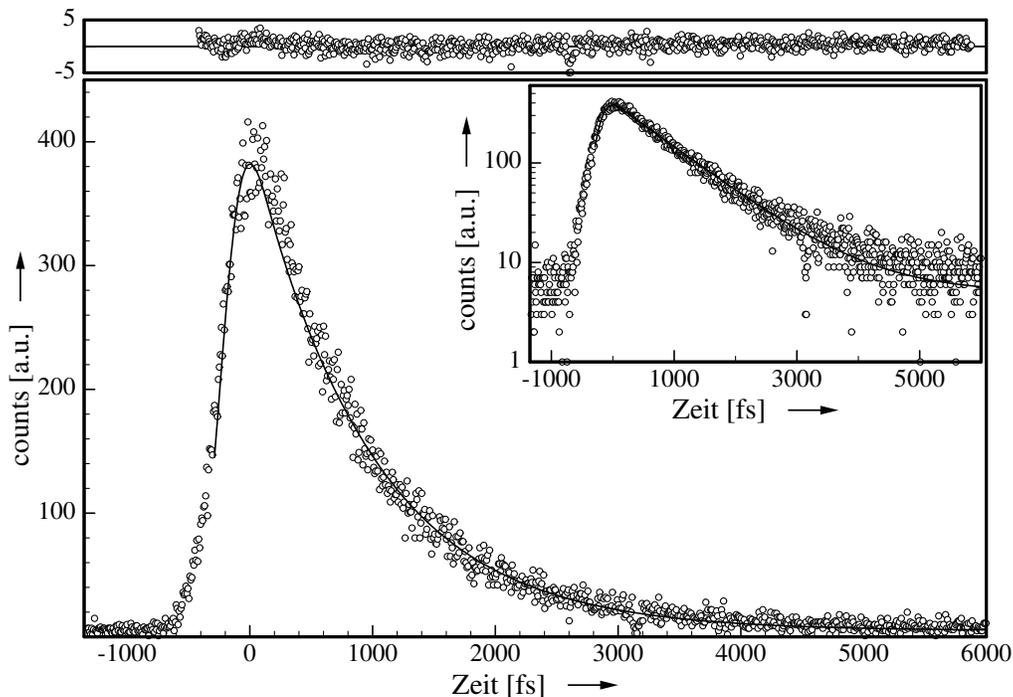


Abb. 6.7: Abklingkurve der S_2 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G und aus der Entfaltung mit der Apparatefunktion ermittelte Fit-Kurve

vor bis 7 ps nach Erreichen des Maximums gewählt. Dem Entfaltungsalgorithmus wird wiederum die aus der Rückfaltung der Malachitgrün- S_2 -Daten gewonnene Apparatefunktion als Erzeugende vorgegeben und die Lebensdauern τ_{S_2} und τ_{S_1} als Parameter frei laufen gelassen. Bei $\chi^2_{red} = 1,1$ errechnet sich die Lebensdauer des S_2 -Zustandes zu $472 \text{ fs} \pm 70 \text{ fs}$ und die des S_1 -Zustandes zu $1587 \text{ fs} \pm 60 \text{ fs}$. Der Vergleich zu den Ergebnis-

Methode der Auswertung	τ_{S_2} [fs]	τ_{S_1} [fs]	χ^2_{red}
S_1 -Daten durch direkte Anpassung		1578 ± 50	1,0
S_1 -Daten durch Entfaltung mit S_2		1500 ± 65	1,2
S_2 -Daten durch Entfaltung mit Apparatefunktion	484 ± 85		1,3
S_1 -Daten durch biexponentielle Entfaltung	472 ± 70	1587 ± 60	1,3

Tab. 6.1: Vergleich der aus den Messungen der S_2 - und S_1 -Daten für Rhodulin Blau 6G durch verschiedene Methoden gewonnenen Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauern

sen aus den Lebensdauerermessungen an Malachitgrün in Ethanol zeigt, daß sowohl die S_2 - als auch die S_1 -Fluoreszenzlebensdauer bei Rhodulin Blau 6G um ungefähr 70% länger sind (siehe dazu Tabellen 4.2, 4.4 und 6.1). Dies bestätigt die anfänglich aufgestellte Annahme.

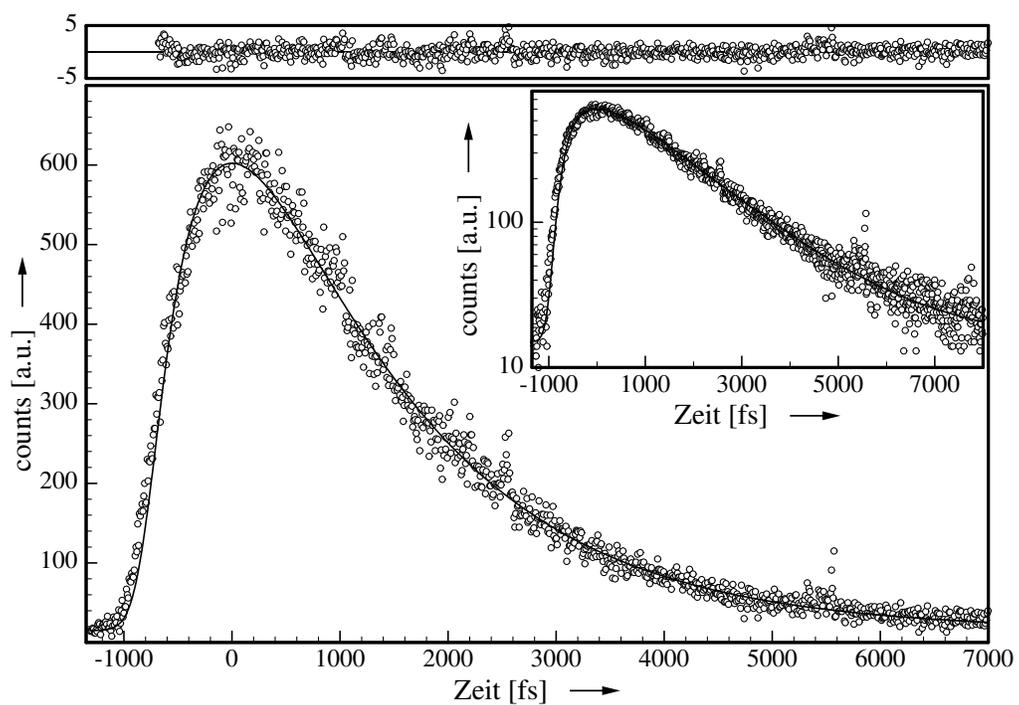


Abb. 6.8: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Rhodulin Blau 6G und aus einem bi-exponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte

6.1.2 Kristallviolett

Kristallviolett gehört in die Gruppe Triaminotriphenylmethan-Farbstoffe. Dieser kationische Farbstoff findet u.a. seinen Einsatz in der Herstellung abriebfester Stifte und Stempel. Die Strukturformel in Abbildung 6.9 zeigt eine gleichmäßige Belegung der

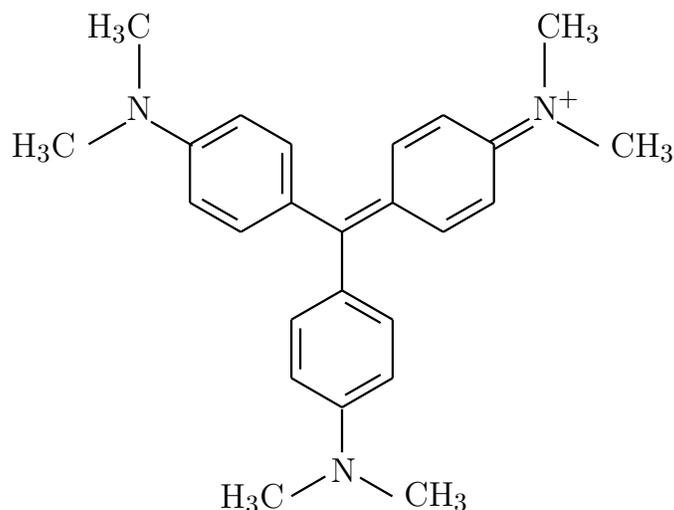


Abb. 6.9: Strukturformel des Farbstoffs Kristallviolett

Benzolringe mit denselben Auxochromen. Dadurch ist eine gleichwertige Beteiligung aller mesomeren Strukturen am Gesamtsystem und damit die gleichmäßige freie Beweglichkeit der π -Elektronen über alle drei Phenylringe hinweg möglich.

Kristallviolett liegt als Salz meist in Form feiner, blauvioletter Nadeln vor. Es löst sich in Wasser und anderen polaren Lösungsmitteln mit einer sehr intensiven violetten Farbe. Das Absorptionsspektrum von Kristallviolett in Abbildung 6.10 zeigt, daß bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit einer Laserwellenlänge von 830 nm der vordere Teil der Absorptionsbande des S_1 -Zustandes des Moleküls erreicht wird. Wie von Rao et al. gezeigt wurde [14, 81], liegt die Fluoreszenzwellenlänge um die 670 nm. Dazu wird zur Detektion ein Interferenzfilter von 370 nm eingesetzt.

Die Lebensdauer des S_1 -Zustandes von $2122 \text{ fs} \pm 80 \text{ fs}$ wird dadurch ermittelt, daß die Kurve in einem Zeitfenster von 1 ps bis 6,6 ps nach Erreichen des Maximums durch eine monoexponentielle Funktion angenähert wird. In Abbildung 6.11 sind die so angepaßte Funktion und die zugehörigen Meßwerte dargestellt. Die Residuen zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung und für χ^2_{red} errechnet sich ein Wert von 1,5. Entsprechend der biexponentiellen Anpassung der S_1 -Fluoreszenz-Meßdaten läßt sich auch für die Meßwerte von Kristallviolett ein Fit in derselben Art und Weise durchführen. Zur Anpassung wird das Zeitfenster zwischen 600 fs vor bis 6,6 ps nach Erreichen des Maximums gewählt. Dem Entfaltungsalgorithmus wird die Apparatefunktion aus der Rückfaltung der S_2 -Daten von Malachitgrün als Erzeugende vorgegeben und die Lebensdauer τ_{S_1} als Parameter frei laufen gelassen. Zusätzlich wird ein zweiter freier Parameter benötigt, der das Auffüllen des Ausgangszustandes der gemessenen S_1 -Fluoreszenz charakterisiert. Dies ist notwendig, da das niedrigste Energieniveau des S_1 -Zustandes von Kristallviolett nicht direkt gepumpt wird. Bei $\chi^2_{red} = 1,8$ errechnet sich für die Lebens-

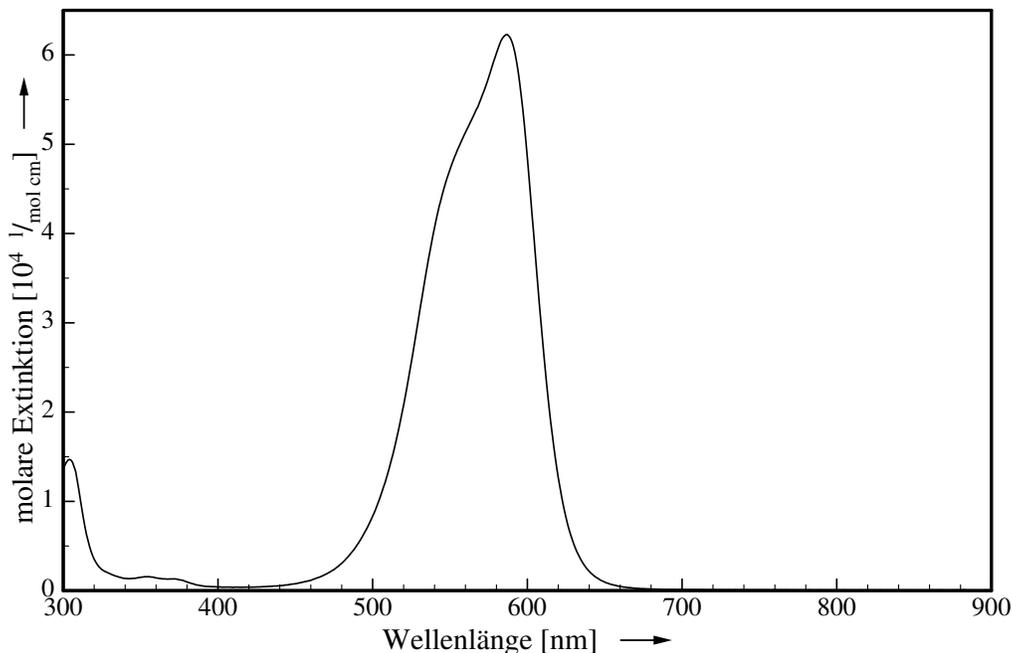


Abb. 6.10: Absorptionsspektrum von Kristallviolett im Lösungsmittel Ethanol

dauer des S_1 -Zustandes ein Wert von $2112 \text{ fs} \pm 95 \text{ fs}$ und für die Relaxationszeit aus den höheren angeregten Zuständen ein Wert von $377 \text{ fs} \pm 80 \text{ fs}$.

In Abbildung 6.12 sind die Meßwerte und die gerechnete Funktion dargestellt. Sowohl in der linearen, als auch in der halblogarithmischen Darstellung zeigt sich eine gute Anpassung des Fits an die gemessenen Werte. Dies wird ebenfalls durch die geringe Variation der Residuen bestätigt.

Die in dieser Arbeit gemessene S_1 -Lebensdauer von Kristallviolett stimmt gut mit dem von Nagasawa et al. in einer neueren Arbeit ermittelten Wert von 2,4 ps überein [68].

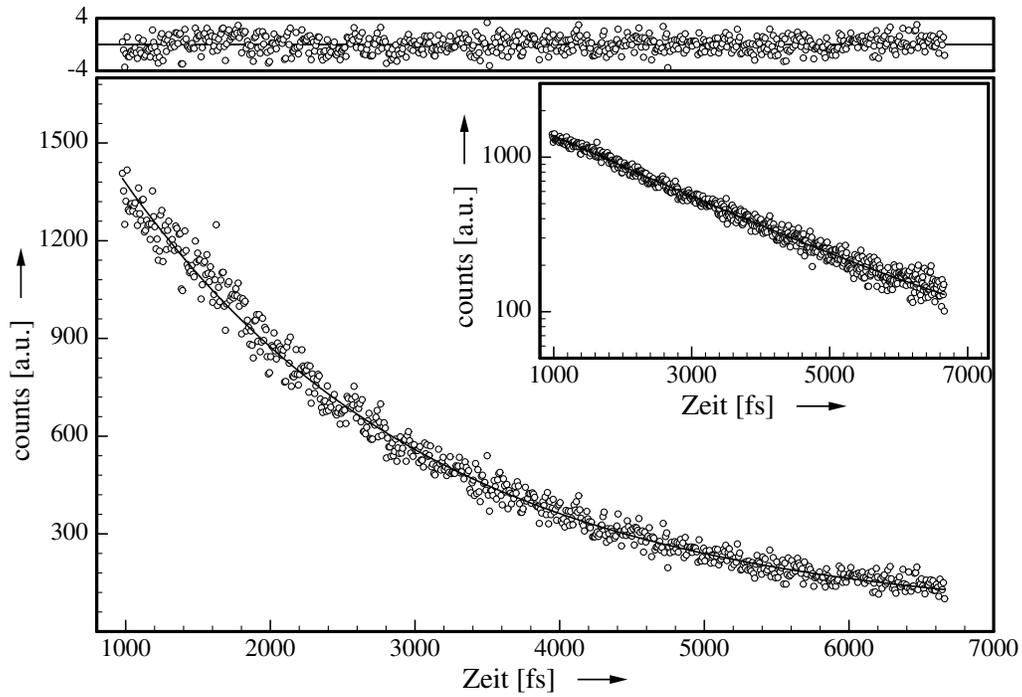


Abb. 6.11: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Kristallviolett im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve zu den im Zeitfenster dargestellten Meßwerten.

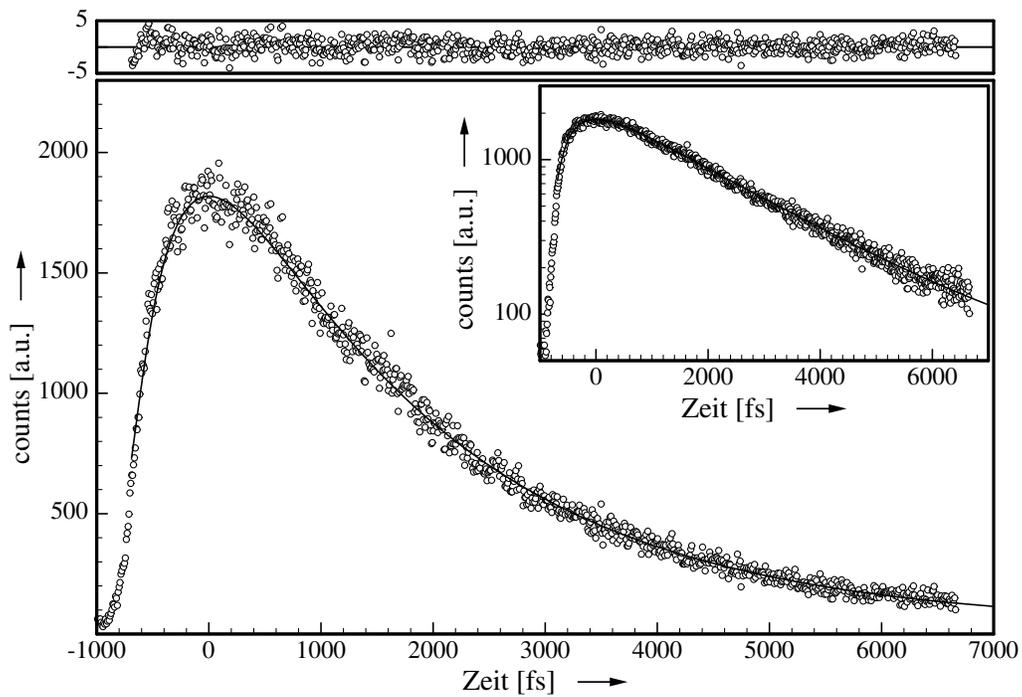


Abb. 6.12: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Kristallviolett und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte

6.1.3 Brilliantgrün

Brilliantgrün gehört wie auch Malachitgrün und Rhodulin Blau 6G zu den Diamino-triphenylmethan-Farbstoffen. Dieser Farbstoff wird ähnlich wie die zuvor genannten Triphenylmethan-Farbstoffe sehr häufig zum Einfärben von Tinte und Toner genutzt, da er unter anderem eine sehr gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und eine hohe Lichtechtheit besitzt. Der Farbstoff liegt in kleinen glitzernden goldfarbenen Kristallen vor. Die Strukturformel des Brilliantgrün-Kations in Abbildung 6.13 zeigt eine große Ähnlichkeit mit der des Rhodulin-Blau-6G-Kations. Die Wasserstoffatome der Aminogruppe wurden jeweils durch zwei Ethylgruppen ausgetauscht. Das Absorptions-

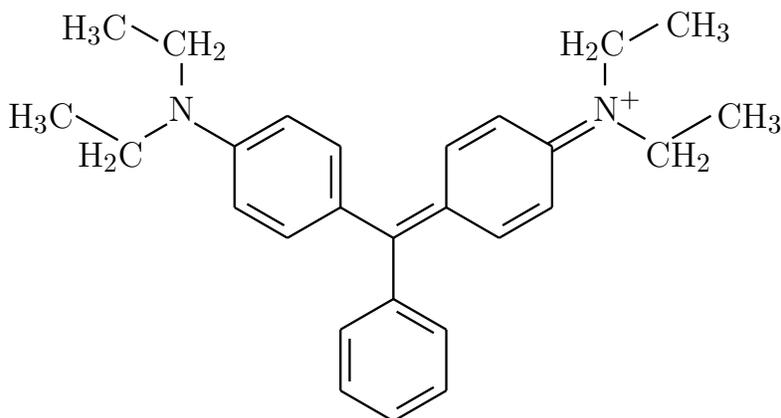


Abb. 6.13: Strukturformel des Farbstoffs Brilliantgrün

spektrum von Brilliantgrün im Lösungsmittel Ethanol zeigt in Abbildung 6.14, daß bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit einer Laserwellenlänge von 830 nm das Absorptionsmaximum des S_2 -Zustands des Moleküls erreicht wird. Die Fluoreszenzwellenlängen von Brilliantgrün liegen im Bereich von 455 nm für die S_2 - und 660 nm für die S_1 -Fluoreszenz [69, 70] und werden mit den Interferenzfiltern von 295 nm bzw. 370 nm vermessen. So lassen sich auch hier entsprechend der Lebensdaueremessung bei Malachitgrün die Abklingdauern für den S_2 - und den S_1 -Zustand bestimmen.

Zuerst wird die Lebensdauer des S_1 -Zustandes dadurch ermittelt, daß die Kurve zu späterer Zeit, an der das Füllen des S_1 -Zustandes durch die Relaxation aus dem S_2 -Zustand keine Wirkung mehr zeigt, mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion genähert wird. Durch dieses Verfahren erhält man eine Lebensdauer von $1716 \text{ fs} \pm 100$. In Abbildung 6.15 sind die so angepaßte Funktion und die Meßwerte dargestellt. Das Anpassen der errechneten Funktion findet im Zeitfenster von 7 ps bis 19 ps nach Erreichen des Maximums statt. Die Residuen zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung und für χ^2_{red} errechnet sich ein Wert von 1,5.

Für die Entfaltung der S_1 -Meßdaten mit den S_2 -Werten ergibt sich die in Abbildung 6.16 dargestellte Kurve. Der Fit findet in einem Zeitfenster von 500 fs bis 7 ps nach Erreichen des Maximums statt. Bei einem $\chi^2_{red} = 0,9$ erhält man für die S_1 -Fluoreszenzlebensdauer einen Wert von $1804 \text{ fs} \pm 75 \text{ fs}$.

Die S_2 -Lebensdauer von Brilliantgrün wird mit der aus der Rückfaltung der S_2 -Fluoreszenz des Farbstoffs Malachitgrün gewonnenen Apparatefunktion bestimmt. Dafür wird

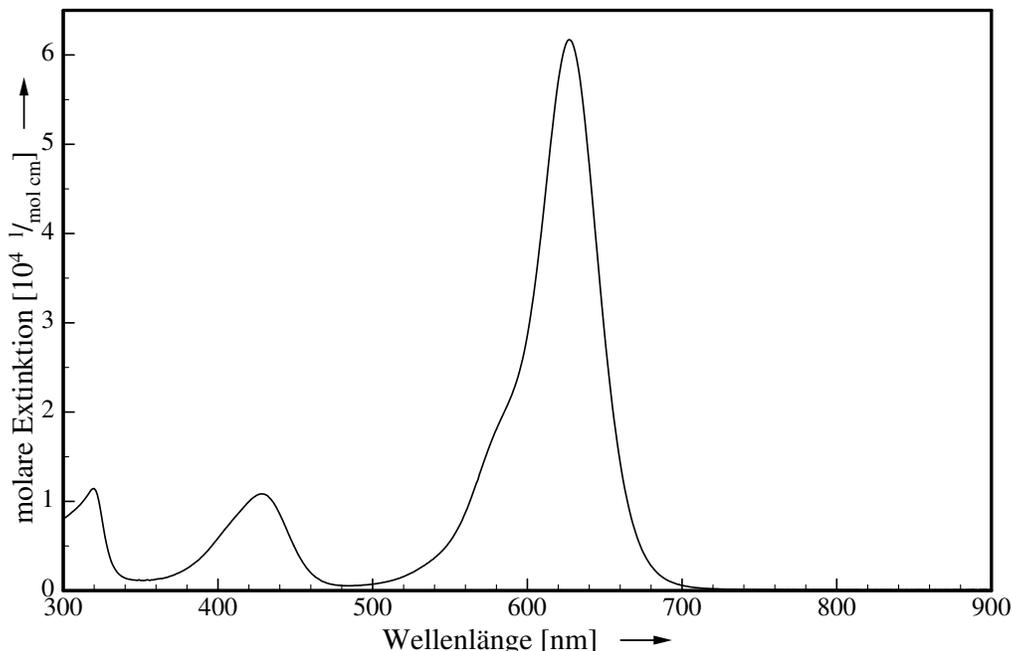


Abb. 6.14: Absorptionsspektrum von Brilliantgrün im Lösungsmittel Ethanol

ein monoexponentielles Abklingen der S_2 -Lebensdauer angenommen. Das Anpassen der Exponentialfunktion findet über die Minimierung des Fehlerquadrates in einem Zeitfenster von 200 fs vor bis 3,4 ps nach Erreichen des Maximums statt. Die über den Fit erzeugte Funktion zeigt eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Werten. Für die Lebensdauer errechnet sich ein Wert von $425 \text{ fs} \pm 75 \text{ fs}$ bei $\chi^2_{red} = 0,9$. Die errechnete Fit-Funktion und die Meßdaten sind in Abbildung 6.17 aufgeführt. In der halblogarithmischen Darstellung des Insets ist sehr gut zu erkennen, daß die Anpassung auch im Bereich des oberen Anstiegs mit den gemessenen Werten übereinstimmt. Die Residuen zeigen insgesamt eine sehr gleichmäßige Verteilung.

An den Daten der S_1 -Fluoreszenz von Brilliantgrün lassen sich die Zeiten für die S_2 - und S_1 -Lebensdauern auch durch einen biexponentiellen Fit überprüfen. Dazu wird eine Anpassung in einem Zeitfenster zwischen 400 fs vor bis 7 ps nach Erreichen des Maximums gewählt. Dem Entfaltungsalgorithmus wird wiederum die Apparatefunktion aus

Methode der Auswertung	τ_{S_2} [fs]	τ_{S_1} [fs]	χ^2_{red}
S_1 -Daten durch direkte Anpassung		1716 ± 100	1,5
S_1 -Daten durch Entfaltung mit S_2		1804 ± 75	0,9
S_2 -Daten durch Entfaltung mit Apparatefunktion	425 ± 75		0,9
S_1 -Daten durch biexponentielle Entfaltung	377 ± 75	1822 ± 90	1,8

Tab. 6.2: Vergleich der aus den Messungen der S_2 - und S_1 -Daten für Brilliantgrün durch verschiedene Methoden gewonnenen Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauern

der Rückfaltung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün als Erzeugende vorgegeben und

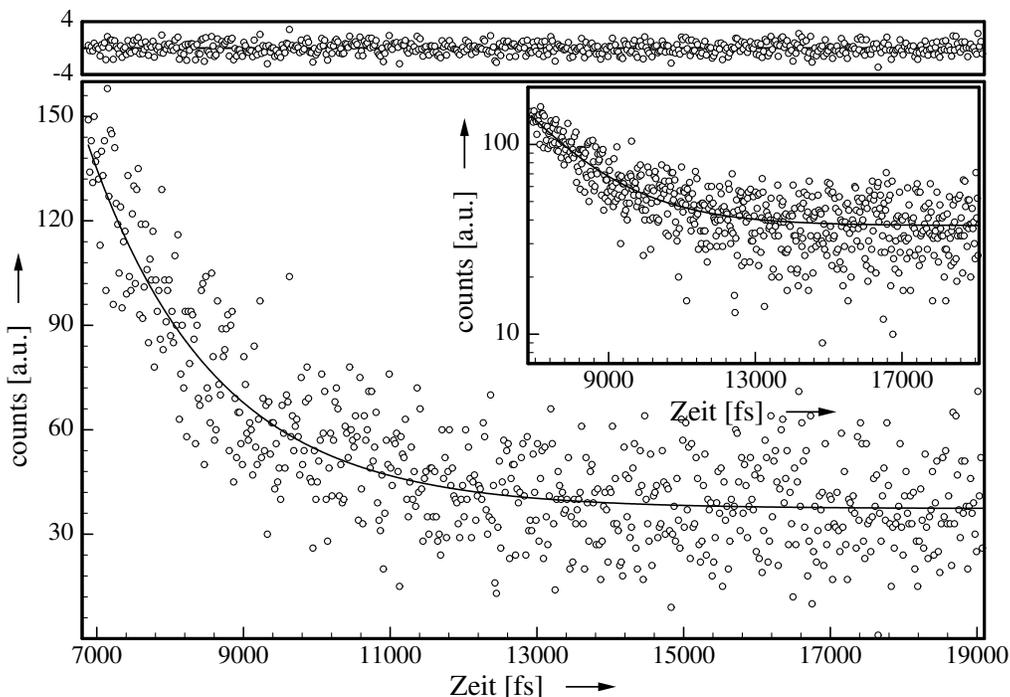


Abb. 6.15: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Brilliantgrün im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve zu den im Zeitfenster dargestellten Meßwerten

die Lebensdauern τ_{S_2} und τ_{S_1} als Parameter frei laufen gelassen. Bei $\chi^2_{red} = 1,8$ errechnet sich die Lebensdauer des S_2 -Zustandes zu $377 \text{ fs} \pm 75 \text{ fs}$ und die des S_1 -Zustandes zu $1822 \text{ fs} \pm 90 \text{ fs}$. Die Werte stimmen unter Berücksichtigung der dazugehörigen Toleranzen mit den vorher ermittelten überein. In Tabelle 6.2 sind die aus den Einzelmessungen an Brilliantgrün gewonnenen Lebensdauern aufgeführt. Daraus ist abzulesen, daß die S_2 -Lebensdauer in einem Bereich von 400 fs und die S_1 -Lebensdauer im Bereich von 1800 fs liegt. Nagasawa et al. haben in einer neueren Arbeit als Ergebnisse von *pump-and-probe*-Messungen Lebensdauern von Brilliantgrün in Ethanol bestimmt [70]. Die Auswertung erfolgte mit einem multiexponentiellen Ansatz und lieferte Zeiten von 620 fs für die S_2 -Lebensdauer und 2500 fs für die S_1 -Lebensdauer. Als Gründe für die Abweichung der Werte von den in dieser Arbeit bestimmten Größen können die von Nagasawa et al. zusätzlich gewählten freien Parameter und deren größere Streubreite der Meßergebnisse genannt werden.

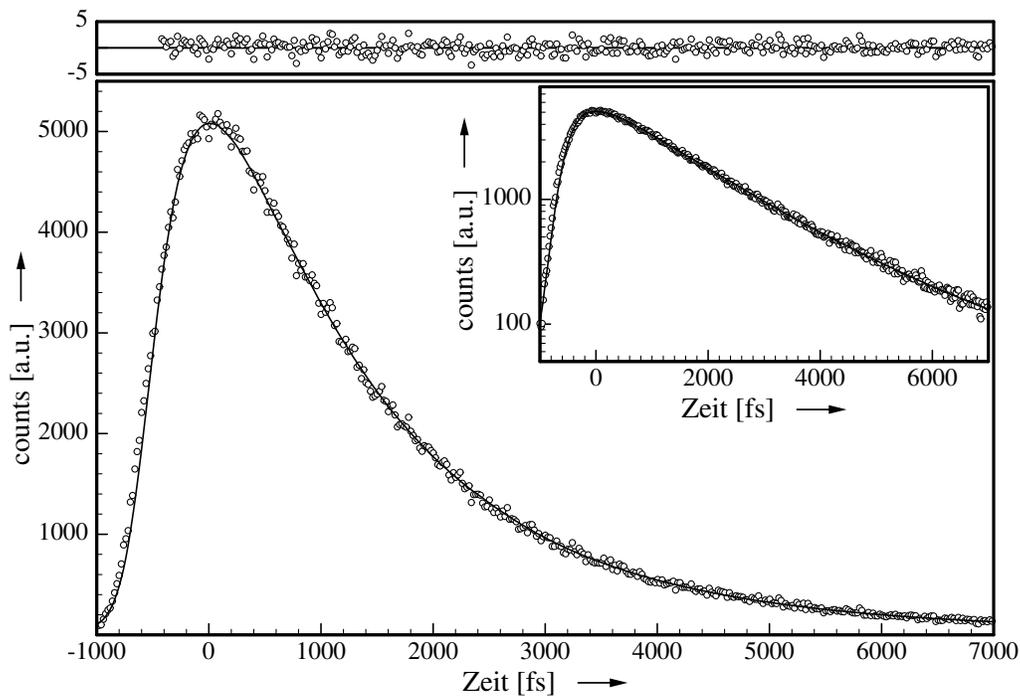


Abb. 6.16: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Brilliantgrün und aus der Entfaltung mit den S_2 -Daten berechnete Fit-Kurve

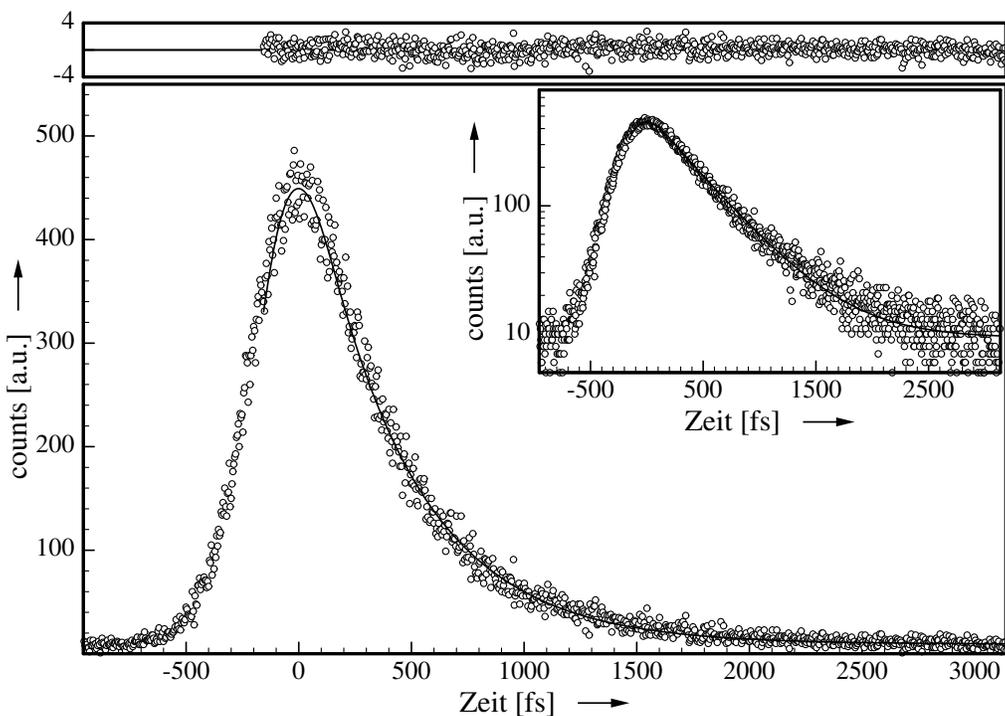


Abb. 6.17: Abklingkurve der S_2 -Fluoreszenz von Brilliantgrün und aus der Entfaltung mit der Apparatfunktion ermittelte Fit-Kurve

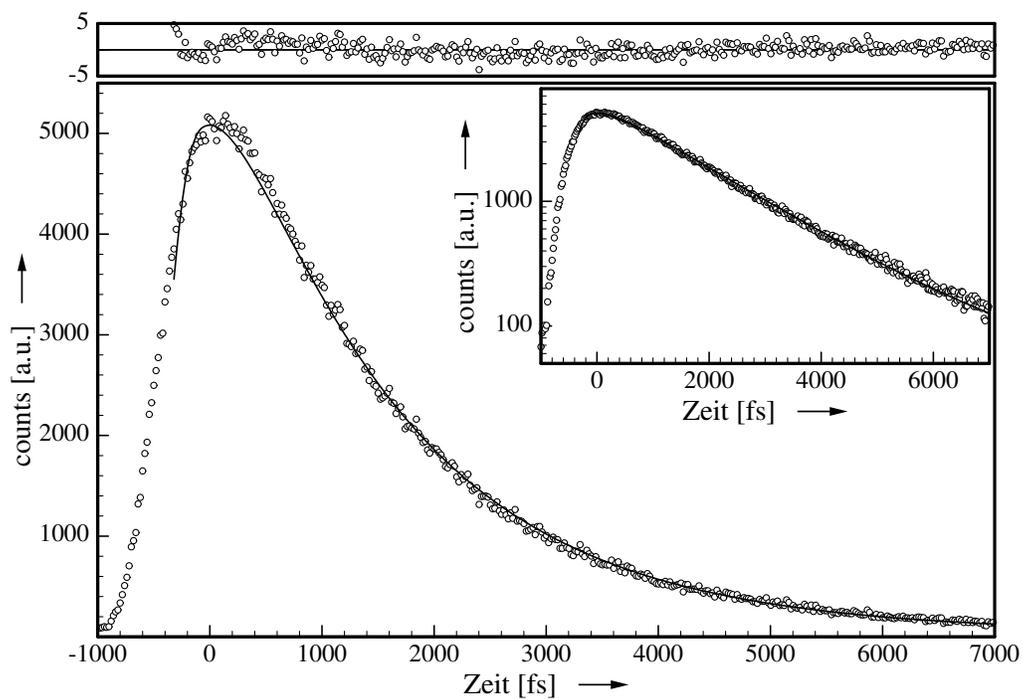


Abb. 6.18: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Brilliantgrün und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatefunktion ermittelten Werte

6.2 DASPI

DASPI (2-(p-Dimethylaminostyryl)-pyridylmethyl-Iodid) ist ein Laserfarbstoff, der unter der Bezeichnung „LC 4650“ geführt wird. Er besitzt eine sehr gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln.

In Abbildung 6.19 ist die Struktur des Kations dargestellt. Das Absorptionsspektrum

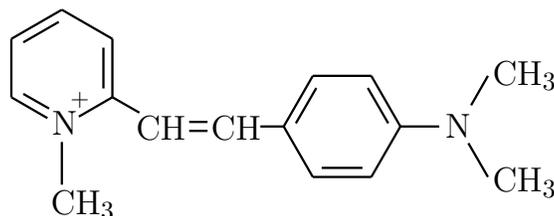


Abb. 6.19: Strukturformel der Farbstoffs DASPI

von DASPI im Lösungsmittel Ethanol in Abbildung 6.20 zeigt, daß bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit einer Laserwellenlänge von 830 nm das Absorptionsmaximum des Moleküls erreicht wird. Mit einem Interferenzfilter der Wellenlänge 340 nm wird die Fluoreszenz bei 580 nm detektiert. Auch hier wird die Lebensdauer zuerst da-

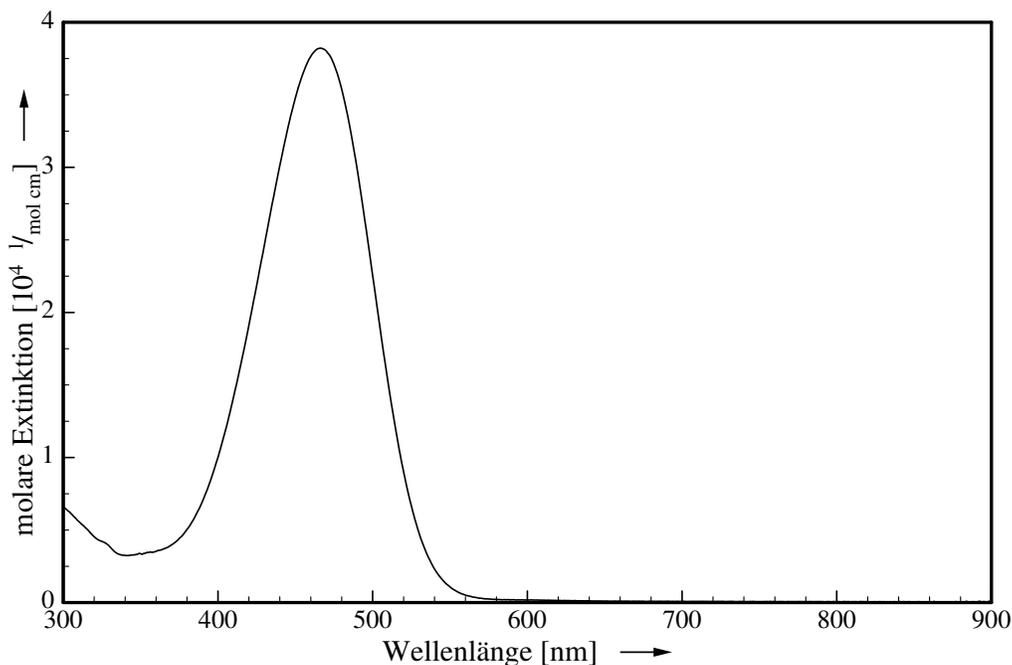


Abb. 6.20: Absorptionsspektrum von DASPI im Lösungsmittel Ethanol

durch ermittelt, daß die Kurve zu späterer Zeit mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion angenähert wird. Durch dieses Verfahren erhält man eine Lebensdauer von $6704 \text{ fs} \pm 140 \text{ fs}$. In Abbildung 6.21 sind die so angepaßte Funktion und die Meßwerte dargestellt. Das Anpassen der errechneten Funktion findet im Zeitfenster von 300 fs bis 1,7 ps nach Erreichen des Maximums statt. Die Residuen zeigen eine sehr gleichmäßige

Verteilung und für χ^2_{red} errechnet sich ein Wert von 1,3. Zur Beurteilung eines große-

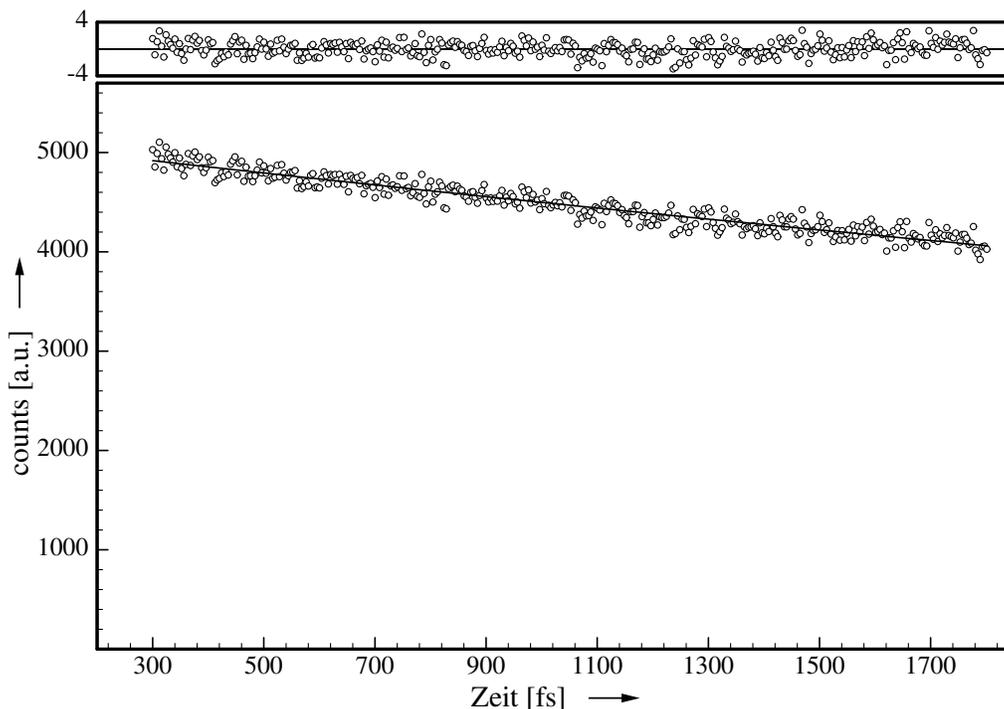


Abb. 6.21: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von DASPI im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve zu den im Zeitfenster dargestellten Meßwerten

ren Zeitfensters innerhalb der Meßdaten, wird ein biexponentieller Fit vorgenommen. Damit läßt sich auch das Auffüllen des angeregten Zustands beschreiben. Zur Anpassung wird das Zeitfenster zwischen 700 fs vor bis 2 ps nach Erreichen des Maximums gewählt. Dem Entfaltungsalgorithmus wird die Apparatefunktion aus der Rückfaltung der S_2 -Fluoreszenz des Farbstoffs Malachitgrün als Erzeugende vorgegeben und die Lebensdauer τ_{S_1} als Parameter frei laufen gelassen. Zusätzlich wird ein zweiter freier Parameter benötigt, der das Auffüllen des S_1 -Zustandes charakterisiert. Bei $\chi^2_{red} = 1,9$ errechnet sich die Lebensdauer des S_1 -Zustandes zu $6589 \text{ fs} \pm 125 \text{ fs}$ und die Relaxationszeit in den angeregten S_1 -Zustand zu $196 \text{ fs} \pm 50 \text{ fs}$.

In Abbildung 6.22 sind die Meßwerte und die gerechnete Funktion dargestellt. Sowohl in der linearen, als auch in der halblogarithmischen Darstellung zeigt sich eine gute Anpassung des Fits an die gemessenen Werte, was durch Betrachtung der Residuen bestätigt wird. Jonkman et al. haben in einem UPC-System die Lebensdauern von DASPI bei verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen gemessen [54]. Deren Ergebnis bei einer Wellenlänge von 571 nm stimmt mit der in dieser Arbeit gemessenen Lebensdauer τ_{S_1} bei 580 nm gut überein.

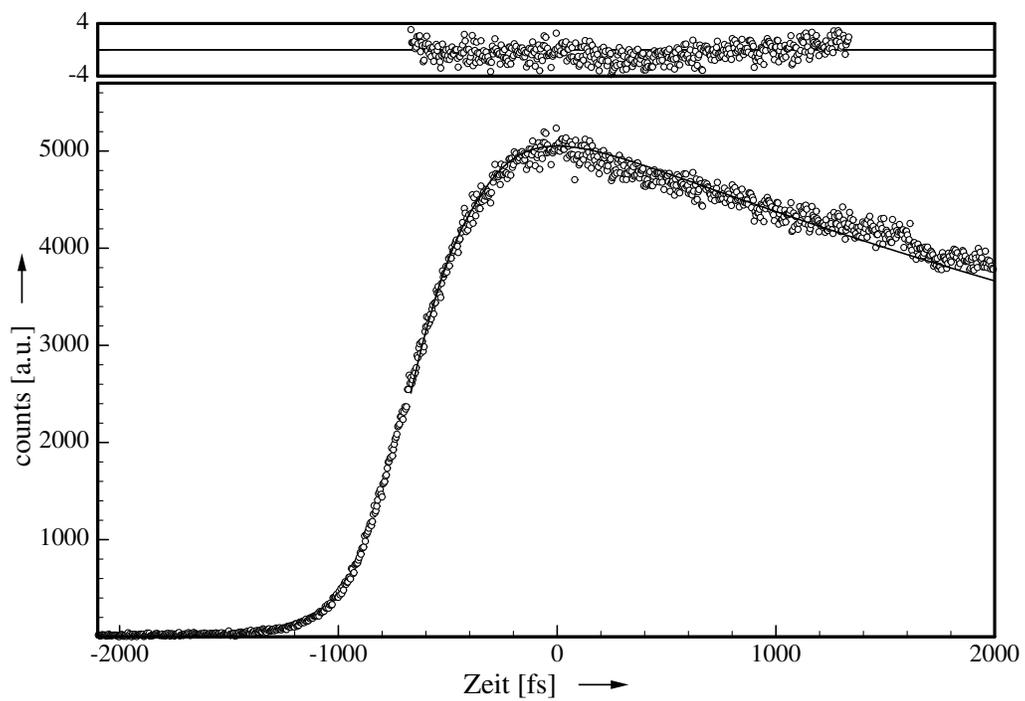


Abb. 6.22: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von DASPI und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte

6.3 Cumarin

Der Name des Farbstoffs Cumarin, der in der Natur zum Beispiel in Blüten und Blättern vieler Gras- und Kleearten vorkommt und auch dem Waldmeister den charakteristischen Geruch verleiht, leitet sich vom spanischen *cumarú* (Tonkabohnenbaum) ab. Die Cumarine, die hier Verwendung finden, sind synthetische Derivate und besitzen eine sehr gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln [84].

Das Cumarin wird häufig aufgrund seiner hohen Fluoreszenzquantenausbeute als Chromophor ausgewählt, an das weitere funktionelle Gruppen substituiert sind. Die Cumarin-Farbstoffe reagieren sehr empfindlich auf hohe Bestrahlungsstärken, die irreversible photochemische Reaktion induzieren können. Zur Messung wird daher die Lösung dauerhaft umgewälzt, gepumpt und die Anregungsintensität verringert.

Cumarin 152

Die Strukturformel des Cumarin 152 in Abbildung 6.23 stellt das Chromophor mit zwei funktionellen Gruppen ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ und $-\text{CF}_3$) dar. Abbildung 6.24 zeigt das Absorpti-

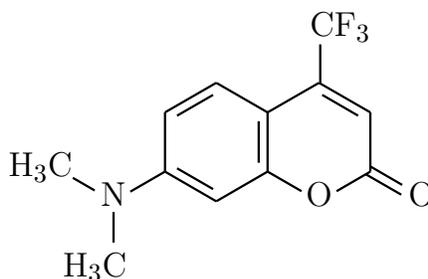


Abb. 6.23: Strukturformel des Farbstoffs Cumarin 152

onsspektrum von Cumarin 152 im Lösungsmittel Ethanol. Bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit einer Laserwellenlänge von 830 nm wird der langwelligere Teil der Absorptionsbande erreicht. Zur Detektion wird das Fluoreszenzmaximum von Cumarin 152 in Ethanol bei 510 nm mit einem Interferenzfilter von 315 nm ausgewählt. Mit der Methode, die Lebensdauer erst durch Anpassung zu späterer Zeit durchzuführen, wird die Abklingdauer der Fluoreszenz aus dem S_1 -Zustand ermittelt. Mit Hilfe des Fits einer monoexponentiellen Funktion erhält man durch dieses Verfahren eine Lebensdauer von $9421 \text{ fs} \pm 80 \text{ fs}$. In Abbildung 6.25 sind die Fit-Funktion und die Meßwerte dargestellt. Das Anpassen der errechneten Funktion findet im Zeitfenster von 200 fs bis 2,8 ps nach Erreichen des Maximums statt. Die Residuen zeigen eine gleichmäßige Verteilung und für χ^2_{red} errechnet sich ein Wert von 1,4.

Zur Beurteilung eines größeren Zeitfensters innerhalb der Meßdaten wird ein biexponentieller Fit vorgenommen, damit das Auffüllen des angeregten Zustandes funktionell erfaßt werden kann. Zur Anpassung wird das Zeitfenster zwischen 700 fs vor bis 2,8 ps nach Erreichen des Maximums ausgewählt. Dem Entfaltungsalgorithmus wird die Apparatefunktion aus der Rückfaltung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün als Erzeugende vorgegeben und die Lebensdauer τ_{S_1} als Parameter frei laufen gelassen. Zusätzlich wird ein zweiter freier Parameter benötigt, der das Auffüllen des S_1 -Zustandes

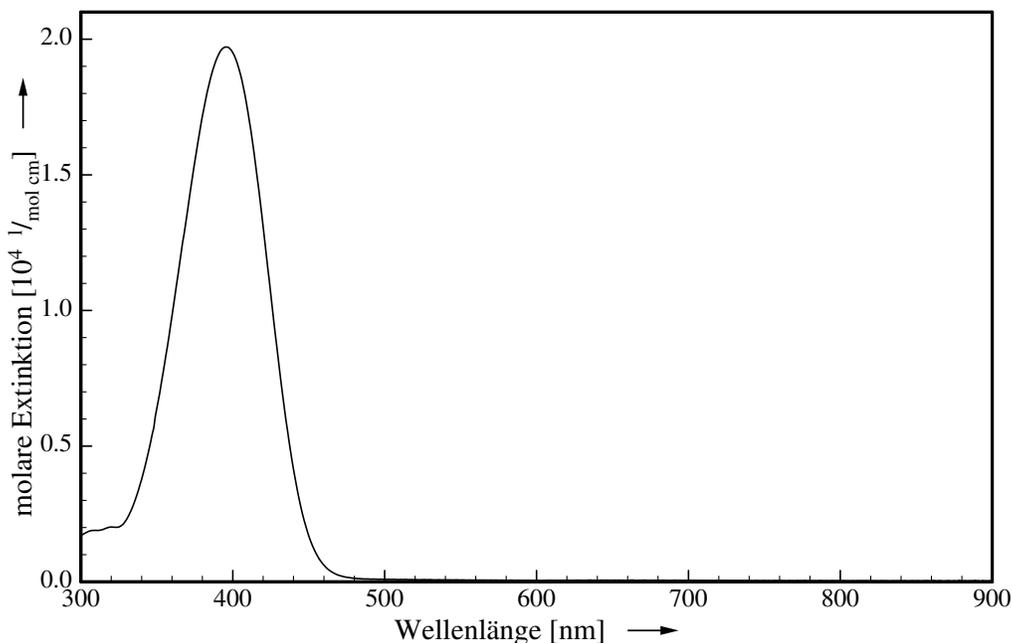


Abb. 6.24: Absorptionsspektrum von Cumarin 152 im Lösungsmittel Ethanol

charakterisiert. Bei $\chi^2_{red} = 1,4$ errechnet sich die Lebensdauer des S_1 -Zustandes zu $9191 \text{ fs} \pm 115 \text{ fs}$ und die Relaxationszeit in den angeregten S_1 -Zustand zu $123 \text{ fs} \pm 65 \text{ fs}$. In Abbildung 6.26 sind die Meßwerte und die gerechnete Funktion dargestellt. Sowohl in der linearen, als auch in der halblogarithmischen Darstellung zeigt sich eine gute Anpassung des Fits an die gemessenen Werte. Dies bestätigt sich auch bei Betrachtung der Residuen.

Cumarin 30

Cumarin 30 ist ebenfalls ein synthetisches Derivat der Cumarine. Die drei substituierten funktionellen Gruppen vergrößern das delokalisierte π -Elektronensystems, womit sich eine geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums in den langwelligeren Bereich erklärt.

Die Strukturformel wird in Abbildung 6.27 gezeigt. Das Absorptionsspektrum von Cumarin 30 im Lösungsmittel Ethanol ist in Abbildung 6.28 dargestellt. Bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit einer Laserwellenlänge von 830 nm wird der langwelligere Teil der Absorptionsbande erreicht. Auch hier wird die Detektionswellenlänge entsprechend angepaßt. Die Lösungsmittelspektren der Cumarine 152 und 30 unterscheiden sich nicht grundlegend.

Im Folgenden sind die Ergebnisse einer Messung dargestellt, in der Cumarin 30 an Bariumsulfat adsorbiert vorliegt. Hier wird die Lebensdauer durch Anpassung einer Fit-Funktion zu späterer Zeit bestimmt. Mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion wird eine Lebensdauer von $1657 \text{ fs} \pm 120 \text{ fs}$ ermittelt. In Abbildung 6.29 sind die so angepaßte Funktion und die Meßwerte aufgetragen. Das Anpassen der errechneten Funktion findet im Zeitfenster von 2,4 fs bis 8,2 ps nach Erreichen des Maximums statt.

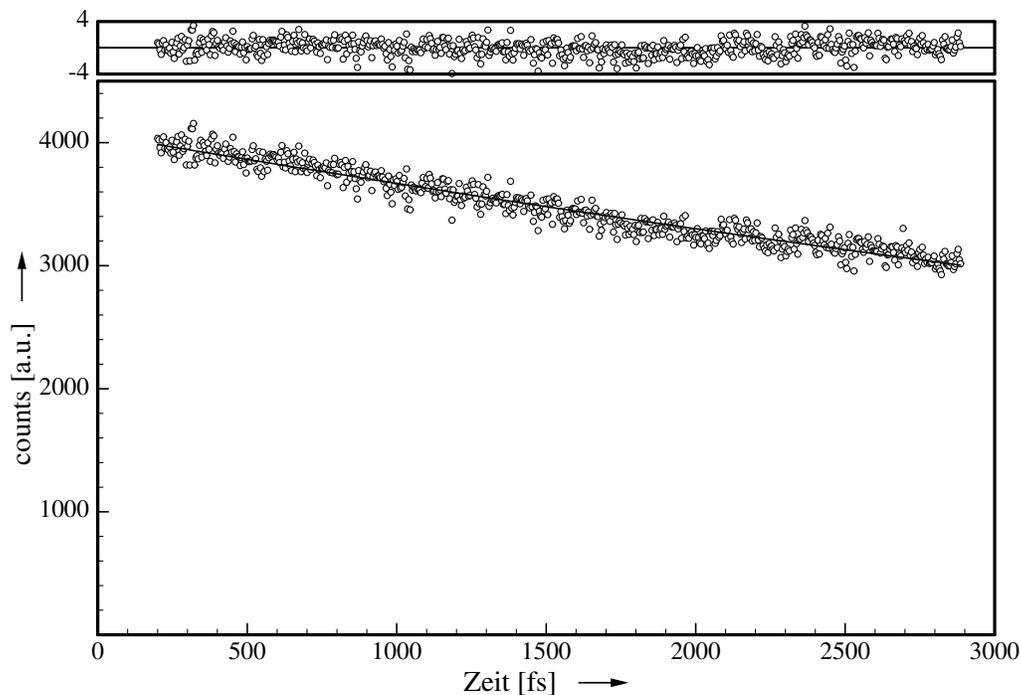


Abb. 6.25: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Cumarin 152 im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve zu den im Zeitfenster dargestellten Meßwerten

Die Residuen zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung und für χ^2_{red} errechnet sich ein Wert von 1,3.

Damit werden Lebensdauermessungen an Cumarinen, die in Lösung häufig Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von Nanosekunden besitzen, dahingehend bestätigt, daß eine schnelle Komponente im Bereich von 10 ps existiert [51, 52, 43, 101]. Für das an Trägermaterialien adsorbierte Cumarin haben Rehm et al. gezeigt [83], daß aufgrund eines Ladungstransfers eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer eintritt. Dies kann hier auch für an Bariumsulfat adsorbiertes Cumarin 30 gezeigt werden.

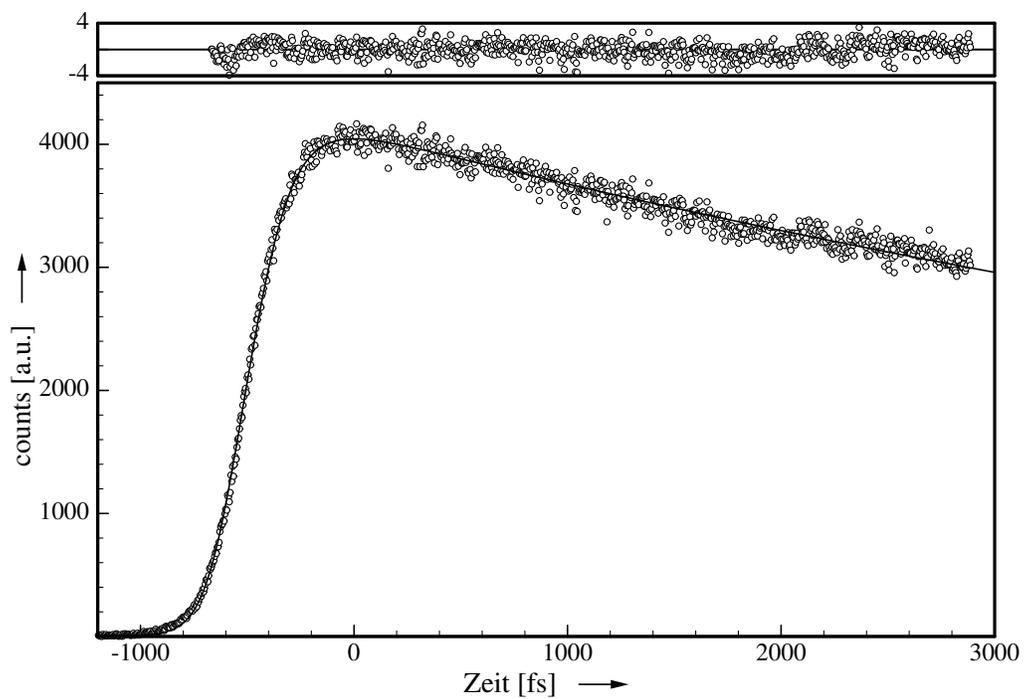


Abb. 6.26: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Cumarin 152 und aus einem biexponentiellen Fit über die Apparatfunktion ermittelten Werte

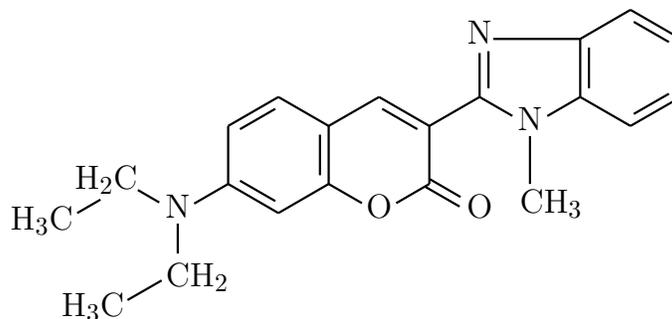


Abb. 6.27: Strukturformel des Farbstoffs Cumarin 30

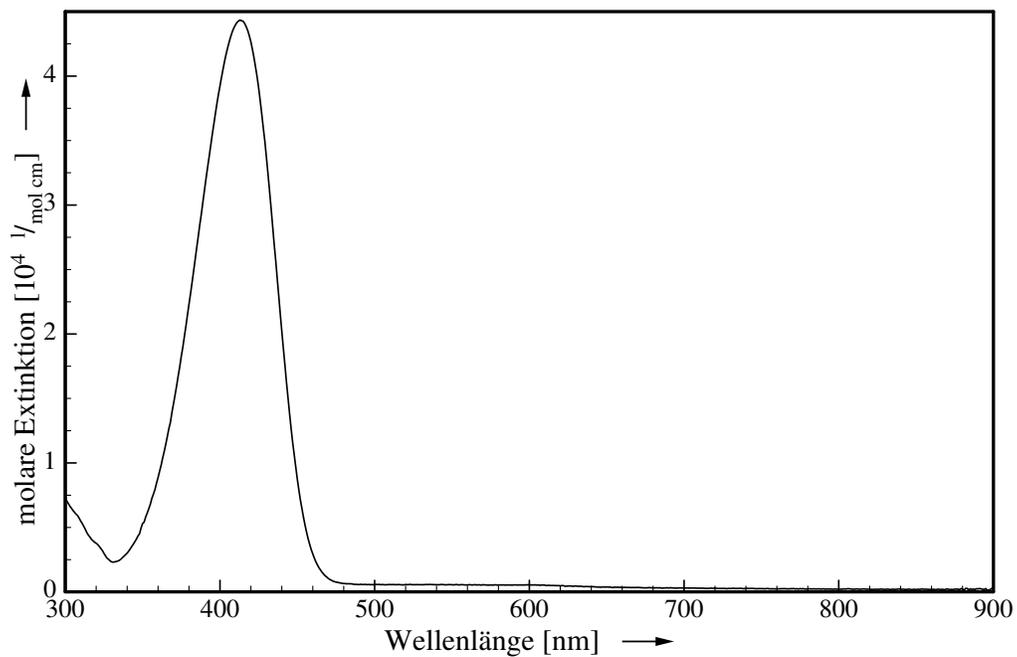
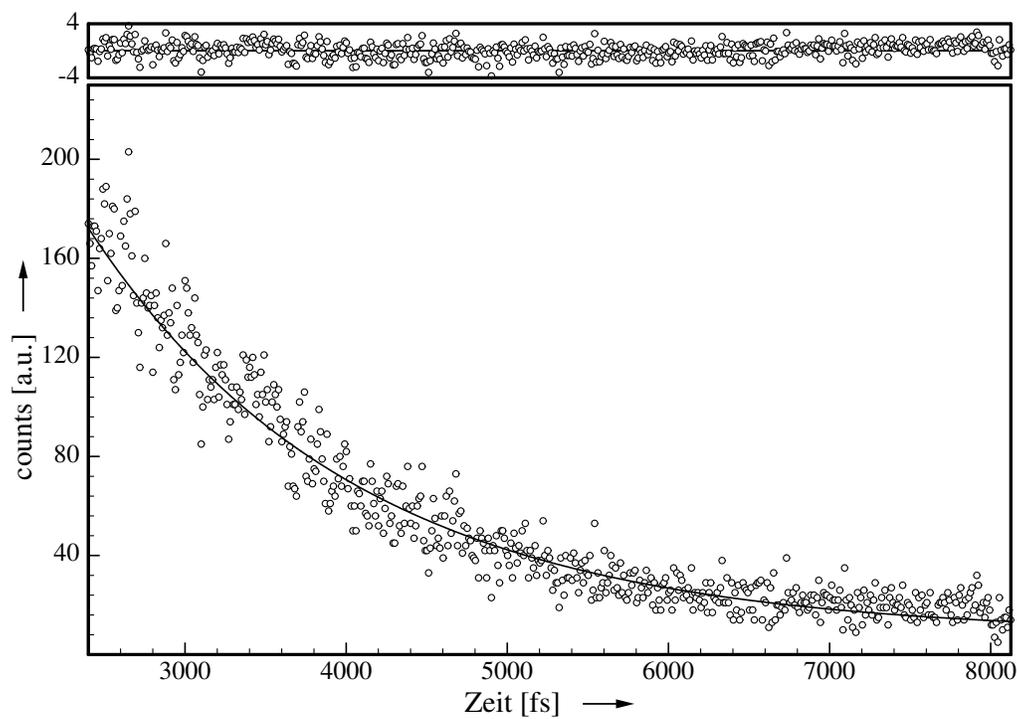


Abb. 6.28: Absorptionsspektrum von Cumarin 30 im Lösungsmittel Ethanol

Abb. 6.29: Abklingkurve der S_1 -Fluoreszenz von Cumarin 30 im Lösungsmittel Ethanol mit der Ausgleichskurve zu den im Zeitfenster dargestellten Meßwerten

6.4 POPOP

POPOP ist ein Farbstoff, der in Form von fluoreszierenden, gelblich filzigen Kristallen vorkommt. Er besitzt eine gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. In Abbil-

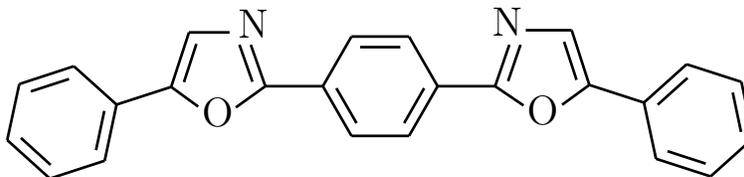


Abb. 6.30: Strukturformel des Farbstoffs POPOP

dung 6.30 wird die Strukturformel des Moleküls gezeigt. Die Abkürzung POPOP leiten sich von den Begriffen Phenyl und Oxazol ab [84].

Das Absorptionsspektrum von POPOP im Lösungsmittel Ethanol in Abbildung 6.31 zeigt, daß bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit einer Laserwellenlänge von 800 nm nur eine geringe Absorption vorliegt, die eine höhere Anregungsintensität der Probe bedingt. Das Detektionssystem wird mittels eines Interferenzfilters von 295 nm auf eine Fluoreszenzwellenlänge von 465 nm eingestellt. POPOP besitzt in Ethanol eine sehr

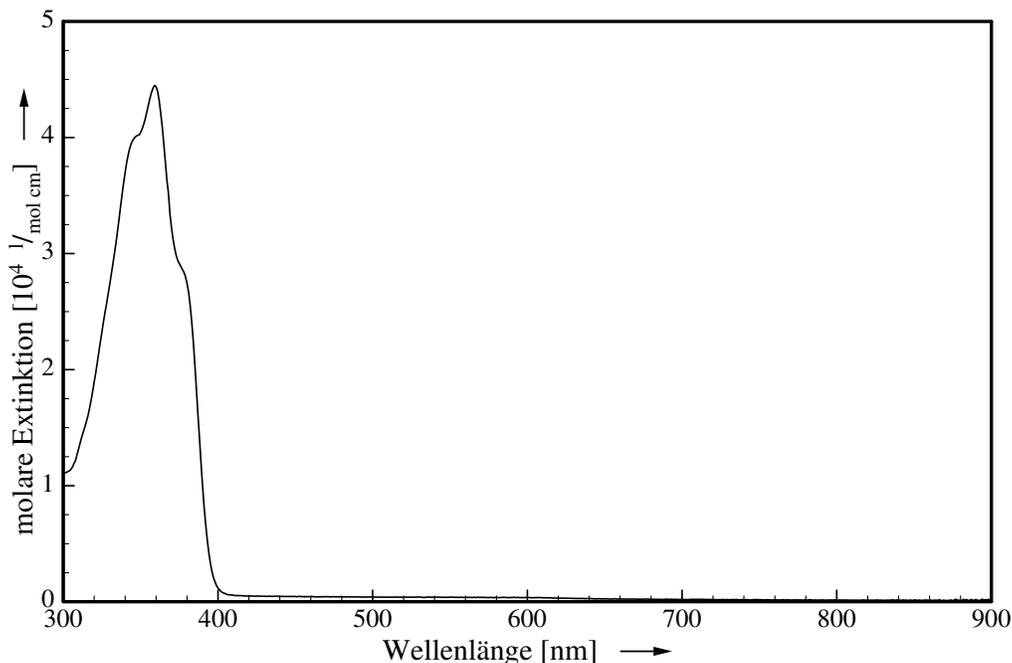


Abb. 6.31: Absorptionsspektrum von POPOP im Lösungsmittel Ethanol

lange Lebensdauer von 1,35 ns, die auch für die Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz in neueren Arbeiten von Gratton et al. bestätigt wird [41]. In den Messungen dieser Arbeit wird gezeigt, daß durch „heiße Fluoreszenz“ [82] zusätzlich eine sehr schnelle Komponente existiert. Mit Hilfe der aus der Rückfaltung der S_2 -Fluoreszenz von Malachitgrün gewonnenen Apparatfunktion ist es möglich, eine Abschätzung der Lebens-

dauer für diese schnelle Komponente anzugeben. In Abbildung 6.32 sind die Meßwerte und die über den Fit erzeugte Funktion dargestellt. Für den Bereich der Anpassung in einem Zeitfenster von 700 fs vor bis 300 fs nach Erreichen des Maximums zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen den gefitteten und den gemessenen Werten. Die Lebensdauer dieser schnellen Komponente errechnet sich dabei zu einem Wert von $231 \text{ fs} \pm 55 \text{ fs}$ bei $\chi^2_{red} = 1,1$.

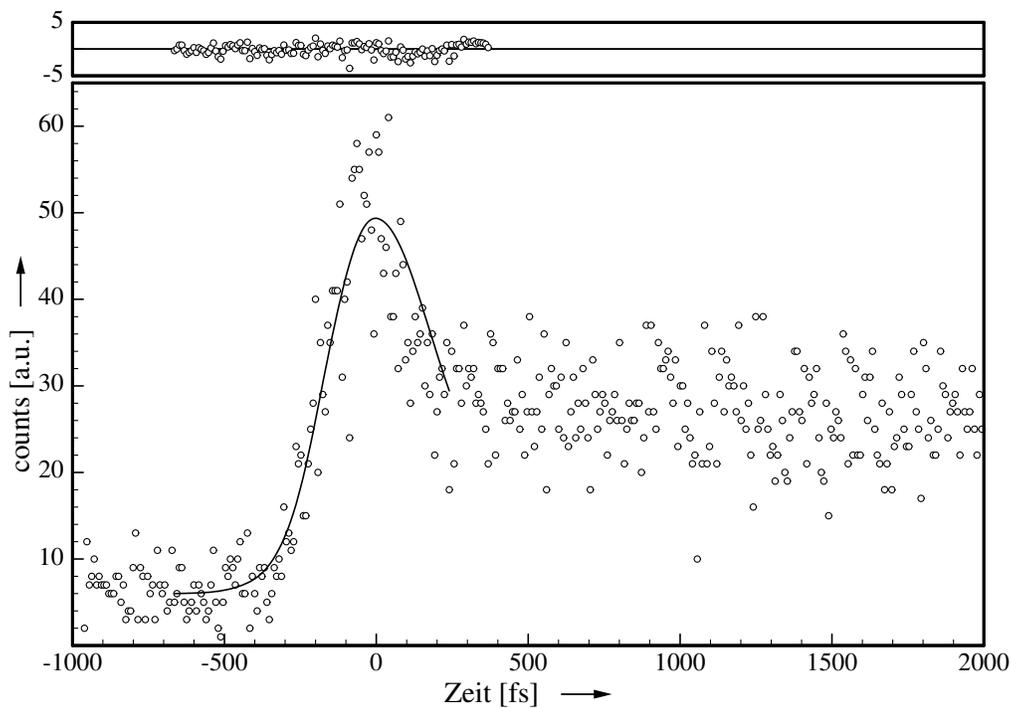


Abb. 6.32: Abklingkurve von POPOP im Lösungsmittel Ethanol und aus der Entfaltung mit der Apparatfunktion ermittelte Fit-Kurve

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die Arbeit beschreibt die erfolgreiche Realisierung eines konfokalen Aufbaus zur ortsaufgelösten Messung von Fluoreszenzlebensdauern im Femtosekunden-Zeitfenster. Es wird hier gezeigt, daß sich die Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz von Proben direkt in einem dreidimensionalen rastermikroskopischen System mit sehr hoher zeitlicher und sehr genauer Ortsauflösung bestimmen läßt. Erste Ergebnisse an ausgewählten Farbstoffen in verschiedenen Lösungen, in kristallisierter Form sowie als Adsorbate an festen Trägermaterialien etablieren die Bedeutung dieses neuen Meßverfahrens für Bereiche der Biologie, der Medizin und der Materialwissenschaften. Beispielsweise sind in der Festkörper- und Halbleiterphysik damit die Voraussetzungen für optimal zeit- und ortsaufgelöste Photolumineszenz-Untersuchungen an Störstellen, Exzitonen oder Dotierungen geschaffen.

Der aufgebaute Titan:Saphir-Laser stellt einen idealen Oszillator mit einer Wiederholrate von 79 MHz für den Betrieb des mikroskopischen Systems dar. Die Wellenlängen lassen sich in einem Bereich von 790 nm bis 830 nm variabel einstellen. In Autokorrelationsmessungen zeigt sich, daß der Laser Pulse mit Breiten von ca. 30 fs bei einer Leistung von 500 mW liefert. Am Ort des Experiments stehen damit bis zu 200 mW Anregungsleistung bzw. 2,5 Nanojoule pro Puls zur Verfügung. Diese Pulse sind mit einer Halbwertsbreite von dort 100 fs nahezu bandbreitenbegrenzt.

Messungen an homogenen Lösungen in unterschiedlicher Probentiefe belegen die Unabhängigkeit der jeweils gemessenen Lebensdauer von den dazwischen liegenden Schichten. Aus diesem Befund geht hervor, daß Fluoreszenzlebensdauern ortsgenau bestimmt werden können und daß das räumliche und zeitliche Auflösungsvermögen des Meßsystems unabhängig von der Position des Meßpunktes ist. Die Ortsauflösung liegt dabei sowohl lateral als auch axial im Bereich eines Mikrometers, wodurch die Untersuchung von kleinsten Probenstrukturen möglich ist.

Durch den Einsatz der *Up-Conversion*-Technik wird eine Zeitauflösung von besser als 150 fs erreicht, was für ein derart komplexes - aus vielen optischen Komponenten bestehendes - mikroskopisches System ein hervorragendes Ergebnis ist. Durch eine aus dem invertierten zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen abgeleitete Methode werden Rauschsignale um den Faktor 250 reduziert und damit die Meßempfindlichkeit soweit gesteigert, daß noch Proben mit sehr geringer Fluoreszenzintensität untersucht werden kön-

nen. Dies ist besonders bei der Analyse fester Proben von Bedeutung, da nur durch eine Reduktion der Anregungsleistung photochemische Veränderungen minimiert werden können.

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist die Ermittlung einer exakten Apparatefunktion, da erst deren Kenntnis eine genaue Analyse ultrakurzer Fluoreszenzlebensdauern erlaubt. Als ausgezeichnete Apparatefunktion für die Zwei-Photonen-Anregung erweist sich hier die Kreuzkorrelation aus der Faltung des frequenzverdoppelten Pulses mit dem Originalpuls. Dieser gemessene Signalverlauf läßt sich mit dem theoretischen Ansatz, die Laserpulse durch einen sech^2 -förmigen Verlauf zu beschreiben, noch weiter optimieren. Mit Hilfe des für diese Arbeit entwickelten Entfaltungsalgorithmus und der beschriebenen Methode zur Bestimmung der Fehler- und Meßgenauigkeit wird gezeigt, daß damit sowohl Anklingen als auch Abklingen der Fluoreszenz hervorragend analysiert und Lebensdauern größer als 150 fs mit einer durchschnittlichen Abweichung von 50 fs präzise bestimmt werden können. Die Streubreiten sind dabei so gering, daß fast immer eine Anpassung mit nur sehr kleinem Fehler möglich ist.

Anhand von Messungen an dem Farbstoff Malachitgrün wird die Leistungsfähigkeit des Meßplatzes exemplarisch überprüft. Nach der Zwei-Photonen-Anregung in den S_2 -Zustand werden die nachfolgenden ultrakurzen Relaxationsprozesse detailliert untersucht und charakterisiert. Sowohl die S_2 -Fluoreszenz (Lebensdauer in Wasser 260 fs) als auch die S_1 -Fluoreszenz (623 fs) können sehr genau in ihrem zeitlichen Ablauf beschrieben werden. Es kann nachgewiesen werden, daß zwischen der S_2 - und der S_1 -Fluoreszenz der erwartete monoexponentielle Zusammenhang besteht, d.h. zeitlich beschreibt die S_2 -Fluoreszenz das Auffüllen des S_1 -Zustands.

Diese Befunde werden in gleicher Weise in der Transmissionsanordnung verifiziert.

Das ultraschnelle Abklingen der S_2 -Fluoreszenz prädestiniert Malachitgrün als idealen Streufluorophor für die Femtosekundspektroskopie. Aus der jetzt bekannten Lebensdauer läßt sich durch Rückfaltung eine perfekte Apparatefunktion bestimmen. So wird auch für zukünftige Anwendungen ein einfacheres „experimentelles Rezept“ als über die Messung der Kreuzkorrelation zur Ermittlung dieser Funktion gegeben.

Der besonders starke Einfluß der direkten molekularen Umgebung auf die Relaxationsprozesse der Triphenylmethanfarbstoffe ist bekannt und begründet die häufige Nutzung dieser Farbstoffe als Fluoreszenzmarker. Dieser Zusammenhang wird besonders evident in der S_1 -Fluoreszenzlebensdauer. In einer Meßreihe mit definierter Variation der Viskosität des Lösungsmittels wird die $\eta^{2/3}$ -Abhängigkeit mit hoher Genauigkeit quantitativ bestätigt.

Bei Adsorption eines Farbstoffs an bestimmte Trägermaterialien kann ein Energietransfer oder eine Elektroneninjektion sehr effizient werden. Diese Effekte werden experimentell an TiO_2 -Nanopartikeln untersucht. Dabei manifestiert sich die starke Kopplung des Malachitgrüns an das Substrat in einer Verkürzung der S_2 -Fluoreszenzlebensdauer (kürzer als 200 fs) und einer nicht mehr nachweisbaren S_1 -Fluoreszenz.

In Messungen zur Bestimmung des Zusammenhangs zwischen der Fluoreszenz- und der Anregungsintensität wird gezeigt, daß die erwartete quadratische Abhängigkeit der

Zwei-Photonen-Anregung nur in den Bereichen kleiner Intensitäten besteht. Die Abweichungen von dieser Proportionalität bei hohen Anregungsintensitäten lassen sich aber durch Berücksichtigung einer nachfolgenden Ein-Photon-Absorption aus dem angeregten Zustand erklären.

An Rodulin Blau 6G - einem weiteren Triphenylmethanfarbstoff - werden erstmals Ergebnisse zu Lebensdauermessungen (S_2 mit 472 fs und S_1 mit 1580 fs) aufgeführt, die Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen strukturellen Eigenschaften dieses Farbstoffs und den gemessenen Fluoreszenzlebensdauern erlauben.

Messungen an Farbstoffproben mit vergleichsweise langen Fluoreszenzlebensdauern zeigen häufig die Existenz zusätzlicher schneller Relaxationsprozesse. Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Farbstoffen DASPI, Cumarin und POPOP werden unter dem Gesichtspunkt der Zwei-Photonen-Anregung diskutiert.

Der Anregungslaser ist in diesem Aufbau so optimiert, daß er Pulse im Wellenlängenbereich zwischen 790 nm und 830 nm liefert. Für andere Untersuchungen ist es durch Anpassung der Spiegelsätze im Resonator und der achromatischen Wellenplatte möglich, diesen Bereich zu verändern. Es könnte auch komplett auf den Einsatz des Rotators verzichtet werden, wenn die komplette Einheit des Ti:Sa-Lasers auf eine Platte vertikal montiert würde. Dadurch könnten Verluste bei der Ein- und Auskopplung verringert und der geringe *Chirp* der Pulse noch weiter reduziert werden.

Wenn auf den Einsatz von Linsen komplett verzichtet werden kann und alle Abbildungen durch Hohlspiegel ersetzt werden, wäre es sinnvoll, die Zeitauflösung dahingehend zu verbessern, daß die Laserpulse zusätzlich außerhalb des Resonators komprimiert werden. In dieser Arbeit wurde bewußt auf diese Modifikation verzichtet, da das System darauf ausgelegt ist, später in vorhandene konfokale mikroskopische Systeme integriert zu werden.

Für genaue wellenlängenselektive Untersuchungen der Fluoreszenzlebensdauer muß eine Auswahl des Fluoreszenzwellenlängenbereichs mit Hilfe eines Monochromators erfolgen, bevor der Anteil im Kristall gemischt wird. Die Umsetzung dieser Erweiterung ist bei der nicht-kollinearen Frequenzmischung allerdings nicht trivial, da der Winkel zwischen dem einlaufenden Fluoreszenzsignal und dem Abtastsignal jeweils für die Wellenlängen angepaßt werden muß.

Literaturverzeichnis

- [1] K. M. Abedin, J. Y. YE, H. Inouye, T. Hattori, H. Sumi, and H. Nakasuka. Diffusive torsional dynamics of malachite green molecules in solid matrices probed by fluorescence decay. *J. Chem. Phys.*, 103(15):6414–6425, Oct 15 1995.
- [2] M. A. Albota, D. Beljonne, J. L. Bredas, J. E. Ehrlich, J. Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Rockel, M. Rumi, G. Subramaniam, W. W. Webb, X. L. Wu, and C. Xu. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*, 281(5383):1653–1656, Sep 11 1998.
- [3] M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Appl. Opt.*, 37(31):7352–7356, Nov 1 1998.
- [4] J. Algermissen. Optisches Frequenzmischen in der Pikosekunden-Spektroskopie. Diplomarbeit, Universität Oldenburg, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg, Dez 1986.
- [5] J. Algermissen. *Ultrakurze Fluoreszenzspektroskopie zur Charakterisierung von Cyaninfarbstoffen*. Dissertation, Universität Oldenburg, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg, 1994.
- [6] M. Anand, A. K. Dharmadhikari, J. A. Dharmadhikari, A. Mishra, D. Mathur, and M. Krishnamurthy. Two-photon pumped lasing from methanol microdroplets doped by a weakly fluorescent dye. *Chem. Phys. Lett.*, 372(1-2):263–268, Apr 22 2003.
- [7] APE GmbH, Plauener Straße 163-165; 13053 Berlin; Germany. *Manual APE Micro*, 1 edition, 1999.
- [8] M. T. Asaki, C. P. Hunag, D. Garvey, J. P. Zhou, H. C. Kapteyn, and M. M. Murnane. Generation of 11-fs pulses from a self-mode-locked ti-sapphire laser. *Opt. Lett.*, 18(12):977–979, Jun 15 1993.
- [9] C. J. Barbe and M. Graetzel. Mesoporous TiO₂ electrodes for photoelectrochemical applications. *Am. Chem. Soc.*, 213:316, Apr 13 1997.
- [10] P. I. H. Bastiaens and A. Squire. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol.*, 9(2):48–52, Feb. 1999.

- [11] Bayer-Aktiengesellschaft. Mitteilungen für die Farbstoffe verarbeitende Industrie. *Bayer-Farben-Revue*, 36(1):47–71, 1984.
- [12] W. Becker, A. Bergmann, M. A. Hink, K. König, K. Benndorf, and C. Biskup. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc. Res. Tech.*, 63(1):58–66, Jan 1 2004.
- [13] W. Becker, H. Hickl, C. Zander, K. H. Drexhage, M. Sauer, S. Siebert, and J. Wolfrum. Time-resolved detection and identification of single analyte molecules in microcapillaries by time-correlated single-photon counting (tcspec). *Rev. Sci. Instrum.*, 70(3):1835–1841, Mar. 1999.
- [14] D. Beljonne, W. Wenseleers, E. Zojer, Z. G. Shuai, H. Vogel, S. J. K. Pond, J. W. Perry, S. R. Marder, and J. L. Bredas. Role of dimensionality on the two-photon absorption response of conjugated molecules: The case of octupolar compounds. *Adv. Funct. Mater.*, 12(9):631–641, Sept. 2002.
- [15] D. Ben-Amotz and C. B. Harris. Torsional dynamics of molecules on barrierless potentials in liquids. i. temperature and wavelength dependent picosecond studies of triphenyl-methane dyes. *J. Chem. Phys.*, 86(9):4856–4870, May 1987.
- [16] D. Ben-Amotz and C. B. Harris. Torsional dynamics of molecules on barrierless potentials in liquids. ii. test of theoretical models. *J. Chem. Phys.*, 86(10):5433–5440, May 1987.
- [17] D. Ben-Amotz and C. B. Harris. Torsional dynamics of molecules on barrierless potentials in liquids. iii. pressure dependent picosecond studies of triphenyl-methane dye solutions in a diamond anvil cell. *J. Chem. Phys.*, 86(11):6119–6127, June 1987.
- [18] A. Bergmann and W. Becker. Fluorescence lifetime imaging in real-time. *Biophys. J.*, 88(1):343A–343A, Jan. 2005.
- [19] E. Betzig and J. K. Trautman. Near-field optics - microscopy, spectroscopy and surface modification beyond the diffraction limit. *Science*, 257(5067):189–195, Jul 10 1992.
- [20] A. C. Bhasikuttan, A. V. Sapre, and T. Okada. Ultrafast relaxation dynamics from the s-2 state of malachite green studied with femtosecond upconversion spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 107(17):3030–3035, May 1 2003.
- [21] T. Bizjak, J. Karpiuk, S. Lochbrunner, and E. Riedle. 50-fs photoinduced intramolecular charge separation in triphenylmethane lactones. *J. Phys. Chem. A*, 108(49):10763–10769, Dez 2004.
- [22] T. Brabec, C. Spielmann, P. F. Curley, and F. Krausz. Kerr lens mode-locking. *Opt. Lett.*, 17(18):1292–1294, Sep 15 1992.

- [23] G. J. Brakenhoff, J. Squier, T. Norris, A. C. Bliton, M. H. Wade, and B. Athey. Real-time two-photon confocal microscopy using a femtosecond, amplified ti:sapphire system. *J. Microsc. Oxford*, 181:253–259, Mar. 1996.
- [24] S. Brustlein, F. Devaux, and E. Lantz. Picosecond fluorescence lifetime imaging by parametric image amplification. *Eur. Phys. J. - Appl. Phys.*, 29(2):161–165, Feb. 2005.
- [25] P. R. Callis. Two-photon-induced fluorescence. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 48:271–297, 1997.
- [26] G. Cerullo, S. Desilvestri, and V. Magni. Self-starting kerr-lens mode-locking of a ti-sapphire laser. *Opt. Lett.*, 19(14):1040–1042, Jul 15 1994.
- [27] Y. E. Chen and A. Periasamy. Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization. *Microsc. Res. Tech.*, 63(1):72–80, Jan 1 2004.
- [28] L. De Boni, C. J. L. Constantino, L. Misoguti, R. F. Aroca, S. C. Zilio, and C. R. Mendonca. Two-photon absorption in perylene derivatives. *Chem. Phys. Lett.*, 371(5-6):744–749, Apr 14 2003.
- [29] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, Apr 6 1990.
- [30] A. Diaspro. Rapid dissemination of two-photon excitation microscopy prompts new applications. *Microsc. Res. Tech.*, 63(1):1–2, Jan 1 2004.
- [31] J. C. Diels and W. Rudolph. *Ultrashort laser pulse phenomena: Fundamentals, techniques and applications on a femtosecond time scale*. San Diego: Academic Press, 1 edition, 1996.
- [32] V. Dmitriev, G. Gurzadyan, and D. Nikogosyan. *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*. Springer Series in Optical Sciences, 3rd corr edition, 1999.
- [33] U. Durig, D. W. Pohl, and F. Rohner. Near-field optical-scanning microscopy. *J. Appl. Phys.*, 59(10):3318–3327, May 15 1986.
- [34] J. Eichler and H. J. Eichler. *Laser - Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 3 edition, 1998.
- [35] M. Fakis, I. Polyzos, G. Tsigaridas, V. Giannetas, and P. Persephonis. Excited state dynamics of a partially conjugated polymer studied by femtosecond fluorescence upconversion spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 394(4-6):372–376, Aug 21 2004.
- [36] U. Flörke and R. Wolff. *Chemie - Spezielle chemische Arbeitsgebiete*. Dümmlers Verlag Bonn, 1 edition, 1984.

- [37] T. Fujino and T. Tahara. Femtosecond fluorescence up-conversion microscopy: Exciton dynamics in alpha-perylene microcrystal. *J. Phys. Chem. B*, 107(22):5120–5122, Jun 5 2003.
- [38] T. Fujino and T. Tahara. Characterization and performance of the femtosecond fluorescence up-conversion microscope. *Appl. Phys. B*, 79(2):145–151, July 2004.
- [39] N. Furukawa, C. E. Mair, V. D. Kleiman, and J. Takeda. Femtosecond real-time pump-probe imaging spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 85(20):4645–4647, Nov. 2004.
- [40] M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, 9(273), 1931.
- [41] E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, Q. Ruan, and N. Barry. Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods. *J. Biomed. Opt.*, 8(3):381–390, July 2003.
- [42] M. Gu and C. J. R. Sheppard. Comparison of 3-dimensional imaging properties between 2-photon and single-photon fluorescence microscopy. *J. Microsc. Oxford*, 177:128–137, Feb. 1995.
- [43] T. Gustavsson, L. Cassara, V. Gulbinas, G. Gurzadyan, J. C. Mialocq, S. Pommeret, M. Sorgius, and P. van der Meulen. Femtosecond spectroscopic study of relaxation processes of three amino-substituted coumarin dyes in methanol and dimethyl sulfoxide. *J. Phys. Chem. A*, 102(23):4229–4245, Jun 4 1998.
- [44] A. Habenicht, J. Hjelm, E. Mukhtar, F. Bergstrom, and L. B. A. Johansson. Two-photon excitation and time-resolved fluorescence. *Chem. Phys. Lett.*, 354:367–375, 2002.
- [45] G. Hackenbroich, C. Viviescas, B. Elattari, and E. Haake. Photocount statistics of chaotic lasers. *Phys. Rev. Lett.*, 86(23):5262–5265, Jun 4 2001.
- [46] H. Haken and H. C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer Berlin, 4 edition, 2003.
- [47] Q. S. Hanley, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy. *Appl. Spectrosc.*, 56(2):155–166, Feb. 2002.
- [48] G. S. He, L. X. Yuan, P. N. Prasad, A. Abbotto, A. Facchetti, and G. A. Pagni. Two-photon pumped frequency-upconversion lasing of a new blue-green dye material. *Opt. Commun.*, 140(1-3):49–52, Jul 15 1997.
- [49] W. Hoffmann, M. Graetzel, and J. Kiwi. Stabilization and characterization of small platinum clusters (less-than 1 nm) on tio2 powders via citrate reduction. *J. Mol. Catal.*, 43(2):183–191, Dec. 1987.

- [50] O. Holub, M. J. Seufferheld, C. Gohlke, , and R. M. Clegg. Fluorescence lifetime imaging (fli) in real-time - a new technique in photosynthesis research. *Photosynth. Res.*, 38(4):581–599, 2000.
- [51] M. L. Horng, J. A. Gardecki, and M. Maroncelli. Rotational dynamics of coumarin 153. *J. Am. Chem. Soc.*, 214:9, Sep 7 1997.
- [52] M. L. Horng, J. A. Gardecki, and M. Maroncelli. Rotational dynamics of coumarin 153: Time-dependent friction, dielectric friction, and other nonhydrodynamic effects. *J. Phys. Chem. A*, 101(6):1030–1047, Feb 6 1997.
- [53] D. R. James, D. R. M. Demmer, R. E. Verrall, and R. P. Steer. Excitation pulse-shape mimic technique for improving picosecond-laser-excited time-correlated single-photon counting deconvolutions. *Rev. Sci. Instrum.*, 54(9):1121–1130, 1983.
- [54] A. M. Jonkman, P. van der Meulen, H. Zhang, and M. Glasbeek. Subpicosecond solvation relaxation of daspi in polar liquids. *Chem. Phys. Lett.*, 256(1-2):21–26, Jun 21 1996.
- [55] K. Kalyanasundaram and M. Gratzel. Photovoltaic performance of injection solar cells and other applications of nanocrystalline oxide layers. *Proc. Indian Acad. Sci.-Chem. Sci.*, 109(6):447–469, Dec. 1997.
- [56] H. C. Kapteyn and M. M. Murnane. *Instruction Manual Model TS Ti:sapphire laser kit (February 7, 1999)*. Kapteyn-Murnane Laboratories L.L.C., Kapteyn-Murnane Laboratories; 1855 S. 57th Ct.; Boulder, CO 80301 USA, 1 edition, 1999.
- [57] J. Karpiuk. Photoinduced electron transfer in malachite green lactone. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5(6):1078–1090, 2003.
- [58] D. A. Keszler. Borates for optical frequency conversion. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 1(2):204–211, 1996.
- [59] S. Kinoshita and T. Kushida. Picosecond fluorescence spectroscopy by time-correlated single-photon counting. *Anal. Instrum.*, 14(3-4):503–524, 1985.
- [60] H. Kuchling. *Taschenbuch der Physik*. Hanser Fachbuchverlag München, 18 edition, 2004.
- [61] J. C. Lagarias, J. A. Reeds, M. H. Wright, and P. E. Wright. Convergence properties of the nelder-mead simplex method in low dimensions. *SIAM J. Optimization*, 9(1):112–147, 1998.
- [62] J. R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic, 2 edition, 1999.

- [63] J. Y. Liu, W. H. Fan, K. L. Han, D. L. Xu, and N. Q. Lou. The study of orientational relaxation in solution using femtosecond time-resolved fluorescence depletion spectroscopy. *Chin. J. Chem. Phys.*, 16(3):161–162, June 2003.
- [64] A. J. Lock, S. Woutersen, and H. J. Bakker. Ultrafast energy equilibration in hydrogen-bonded liquids. *J. Phys. Chem. A*, 105(8):1238–1243, Mar 1 2001.
- [65] G. P. A. Malcolm and A. I. Ferguson. Self-mode locking of a diode-pumped nd-yf laser. *Opt. Lett.*, 16(24):1967–1969, Dec 15 1991.
- [66] Y. Maruyama, O. Magnin, H. Satozono, and M. Ishikawa. Ground- and excited-state isomerization of triphenylmethane dyes in the femtosecond regime. *J. Phys. Chem. A*, 103(29):5629–5635, Jul 22 1999.
- [67] B. R. Masters and P. T. C. So. Antecedents of two-photon excitation laser scanning microscopy. *Microsc. Res. Tech.*, 63(1):3–11, Jan 1 2004.
- [68] Y. Nagasawa, Y. Ando, D. Kataoka, H. Matsuda, and H. Miyasaka. Ultrafast excited state deactivation of triphenylmethane dyes. *J. Phys. Chem. A*, 106(10):2024–2035, Mar 14 2002.
- [69] Y. Nagasawa, Y. Ando, and T. Okada. Solvent dependence of ultrafast ground state recovery of the triphenylmethane dyes, brilliant green and malachite green. *Chem. Phys. Lett.*, 312(2-4):161–168, Oct 22 1999.
- [70] Y. Nagasawa, Y. Ando, and T. Okada. Solvent dependent ultrafast ground state recovery dynamics of triphenylmethane dyes. *J. Chin. Chem. Soc.*, 47(4A):699–704, Aug. 2000.
- [71] H. Nakatsuka, M. Hirai, S. Sekine, Y. Suzuki, and T. Hattori. Site-dependent fluorescence decay of malachite green doped in onion cell. *Jpn. J. Appl. Phys., Part 2*, 38(3B):L324–L326, Mar 15 1999.
- [72] P. Norman, Y. Luo, and H. Agren. Large two-photon absorption cross sections in two-dimensional, charge-transfer, cumulene-containing aromatic molecules. *J. Chem. Phys.*, 111(17):7758–7765, Nov 1 1999.
- [73] Ocean Optics, Inc., Nieuwgraaf 108 G; 6921 RK Duiven; The Netherlands. *Operating Manual and User's Guide: S2000 Miniature Fiber Optic Spectrometers and Accessories*, 1 edition, 1999.
- [74] D. B. O'Connor and D. Phillips. *Time-correlated single photon counting*. Academic Press London, 1 edition, 1984.
- [75] A. V. Oppenheim and R. W. Schaffer. *Discrete-time signal processing*. Prentice-Hall Inc. New Jersey, 2 edition, 1999.
- [76] G. H. Patterson and D. W. Piston. Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophys. J.*, 78(4):2159–2162, Apr. 2000.

- [77] G. Ramakrishna, A. Das, and H. N. Ghosh. Effect of surface modification on back electron transfer dynamics of dibromo fluorescein sensitized tio2 nanoparticles. *Langmuir*, 20(4):1430–1435, Feb 17 2004.
- [78] G. Ramakrishna, H. N. Ghosh, A. K. Singh, D. K. Palit, and J. P. Mittal. Dynamics of back-electron transfer processes of strongly coupled triphenyl methane dyes adsorbed on tio2 nanoparticle surface as studied by fast and ultrafast visible spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 105(51):12786–12796, Dec 27 2001.
- [79] G. Ramakrishna, A. K. Singh, D. K. Palit, and H. N. Ghosh. Slow back electron transfer in surface-modified tio2 nanoparticles sensitized by alizarinâ. *J. Phys. Chem. B*, 108(5):1701–1707, Feb 5 2004.
- [80] J. K. Ranka, R. W. Schirmer, and A. L. Gaeta. Observation of pulse splitting in nonlinear dispersive media. *Phys. Rev. Lett.*, 77(18):3783–3786, Oct 28 1996.
- [81] Y. Rao, X. M. Guo, Y. S. Tao, and H. F. Wang. Observation of the direct s-2 -> s-0 two-photo the hyperpolarizability of crystal violet (cv) scattering measurement. *J. Phys. Chem. A*, 108(39):7977–7982, Sep 30 2004.
- [82] K. Rebane and P. Saari. Hot luminescence and relaxation processes in resonant secondary-emission of solid matter. *J. Lumin.*, 16(3):223–243, 1978.
- [83] J. M. Rehm, G. L. McLendon, Y. Nagasawa, K. Yoshihara, J. Moser, and M. Gratzel. Femtosecond electron-transfer dynamics at a sensitizing dye-semiconductor (tio2) interface. *J. Phys. Chem.*, 100(23):9577–9578, Jun 6 1996.
- [84] H. Römpp. *Römpp Lexikon Chemie*. Thieme Stuttgart, 10 edition, 1996.
- [85] C. Rullie're. *Femtosecond Laser Pulses : Principles and Experiments*. Berlin [u.a.] : Springer, 1998.
- [86] S. Saikan and J. Sei. Investigation of the conformational change in triphenyl-methane dyes via polarization spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 79(9):4154–4158, 1983.
- [87] P. Salek, O. Vahtras, J. D. Guo, Y. Luo, T. Helgaker, and H. Agren. Calculations of two-photon absorption cross sections by means of density-functional theory. *Chem. Phys. Lett.*, 374(5-6):446–452, Jun 18 2003.
- [88] T. Sasaki, Y. Mori, M. Yoshimura, Y. K. Yap, and T. Kamimura. Recent development of nonlinear optical borate crystals: key materials for generation of visible and uv light. *Mater. Sci. Eng., R*, 30(1-2):1–54, 2000.
- [89] W. Schmidt. *Optische Spektroskopie* . VCH Weinheim, 1 edition, 1994.
- [90] P. Sengupta, J. Balaji, S. Banerjee, R. Philip, G. R. Kumar, and S. Maiti. Sensitive measurement of absolute two-photon absorption cross sections. *J. Chem. Phys.*, 112(21):9201–9205, Jun 1 2000.

- [91] G. Stock and W. Domcke. Theory of femtosecond pump-probe spectroscopy of ultrafast internal conversion processes in polyatomic molecules. *Opt. Soc. Am. J. B*, 7:1970–1980, Sept. 1990.
- [92] V. Sundstrom and T. Gillbro. Effects of solvent on tmp photophysics - transition from no barrier case, induced by solvent properties. *J. Chem Phys.*, 81(8):3463–3474, 1984.
- [93] V. Sundstrom, T. Gillbro, and H. Bergstrom. Picosecond kinetics of radiationless relaxations of triphenyl methan dyes - evidence for a rapid excited-state equilibrium between states of differing geometry. *Chem. Phys.*, 73(3):439–458, 1982.
- [94] D. H. Sutter. *New Frontiers of Ultrashort Pulse Generation*. PhD thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, 2000.
- [95] J. Sytsma, J. M. Vroom, C. J. De Grauw, and H. C. Gerritsen. Time-gated fluorescence lifetime imaging and microvolume spectroscopy using two-photon excitation. *J. Microsc.*, 191:39–51, July 1998.
- [96] S. Takeuchi and T. Tahara. Ultrafast fluorescence study on the excited singlet-state dynamics of all-trans-retinal. *J. Phys. Chem. A*, 101(17):3052–3060, Apr 24 1997.
- [97] S. Takeuchi and T. Tahara. Femtosecond ultraviolet-visible fluorescence study of the excited-state proton-transfer reaction of 7-azaindole dimer. *J. Phys. Chem. A*, 102(40):7740–7753, Oct 1 1998.
- [98] H. Tan, G. P. Banfi, and A. Tomaselli. Optical frequency mixing through cascaded 2nd-order processes in beta-barium borate. *Appl. Phys. Lett.*, 63(18):2472–2474, 1993.
- [99] X. J. Tang, L. Z. Wu, L. P. Zhang, and C. H. Tung. Two-photon-pumped frequency-upconverted yellow lasing in a novel dye solution. *Chem. Phys. Lett.*, 356(5-6):573–576, Apr 26 2002.
- [100] P. F. Tian and W. S. Warren. Ultrafast measurement of two-photon absorption by loss modulation. *Opt. Lett.*, 27(18):1634–1636, Sept. 2002.
- [101] P. Toele, H. Zhang, C. Trieflinger, J. Daub, and M. Glasbeek. Femtosecond fluorescence upconversion study of a boron dipyrromethene dye in solution. *Chem. Phys. Lett.*, 368(1-2):66–75, Jan 14 2003.
- [102] M. Trippenbach and Y. B. Band. Dynamics of short-pulse splitting in dispersive nonlinear media. *Phys. Rev. A*, 56(5):4242–4253, Nov. 1997.
- [103] M. Trippenbach, T. C. Scott, and Y. B. Band. Near-field and far-field propagation of beams and pulses in dispersive media. *Opt. Lett.*, 22(9):579–581, May 1 1997.

- [104] M. Vandenzegel, N. Boens, D. Daems, and F. C. Deschryver. Possibilities and limitations of the time-correlated single photon-counting technique - a comparative-study of correction methods for the wavelength dependence of the instrument response function. *Chem. Phys.*, 101(2):311–335, Jan 15 1986.
- [105] C. Viviescas and G. Hackenbroich. Quantum theory of multimode-fields: Applications to optical resonators. *J. Opt. B-Quant. Semiclass. Opt.*, 6(4):211–223, Apr. 2004.
- [106] D. Wang, X. M. Wang, G. Y. Zhou, C. Wang, Z. S. Shao, and M. H. Jiang. Two photon pumped upconversion and nonlinear optical properties of a new lasing dye: Deaspi. *Chin. Phys. Lett.*, 18(7):915–917, July 2001.
- [107] X. M. Wang, D. Wang, W. L. Jiang, and M. H. Jiang. Optical properties of new two-photon-pumped lasing dyes. *Opt. Mater.*, 20(3):217–223, Oct. 2002.
- [108] G. Wittke. *Farbstoffchemie*. Diesterweg Salle Sauerländer, 1 edition, 1979.
- [109] C. Xu, J. Mertz, J. B. Shear, and W. W. Webb. Multiphoton fluorescence excitation. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, 2819:274–276, 1996.
- [110] C. Xu and W. W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.*, 13:481–491, 1996.
- [111] C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, and W. W. Webb. Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20):10763–10768, Oct 1 1996.
- [112] J. H. Xu, X. H. Shen, and J. R. Knutson. Femtosecond fluorescence upconversion study of the rotations of perylene and tetracene in hexadecane. *J. Phys. Chem. A*, 107(41):8383–8387, Oct 16 2003.
- [113] W. J. Yang, D. Y. Kim, C. H. Kim, M. Y. Jeong, S. K. Lee, S. J. Jeon, and B. R. Cho. Triphenylamine derivatives with large two-photon cross-sections. *Org. Lett.*, 6(9):1389–1392, Apr 29 2004.
- [114] M. Yoshizawa, K. Suzuki, A. Kubo, and S. Saikan. Femtosecond study of s-2 fluorescence in malachite green in solutions. *Chem. Phys. Lett.*, 290(1-3):43–48, Jun 26 1998.
- [115] A. H. Zewail. Femtochemistry: Atomic-scale dynamics of the chemical bond using ultrafast lasers (nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39(15):2587–2631, 2000.
- [116] Q. H. Zhong, Z. H. Wang, Y. Sun, Q. H. Zhu, and F. N. Kong. Vibrational relaxation of dye molecules in solution studied by femtosecond time-resolved stimulated emission pumping fluorescence depletion. *Chem. Phys. Lett.*, 248(3-4):277–282, Jan 12 1996.

- [117] G. Y. Zhou, X. M. Wang, D. Wang, C. Wang, X. Zhao, Z. S. Shao, and M. H. Jiang. Two-photon absorption and nonlinear optical properties of a new organic dye deaspi. *J. Mater. Sci. Technol.*, 17:S139–S142, 2001.
- [118] X. Zhou, A. M. Ren, J. K. Feng, and X. J. Liu. The studies on the two-photon absorption cross-sections and the second hyperpolarizabilities of multi-branched stilbene derivatives. *Chem. Phys. Lett.*, 362(5-6):541–548, Aug 26 2002.

Anhang A

Abkürzungen und Kurzformen

Kurzform	Bezeichnung
BBO	- Beta Barium Borat (β -BaB ₂ O ₄)
CCD	- <i>Charge-Coupled Device</i>
CFD	- <i>Constant-Fraction-Discriminator</i>
delay	- Verzögerung
ESA	- <i>Excited-State-Absorption</i>
FLIM	- <i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
FWHM	- <i>Full Width Half Maximum</i> (Halbwertsbreite)
GVD	- <i>Group Velocity Dispersion</i> (Gruppengeschwindigkeits-Dispersion)
KLM	- <i>Kerr Lens Modelocking</i>
LBO	- Lithium Triborat
MG	- Malachitgrün
Nd:YVO ₄	- Neodymium-dotiertes Yttrium Orthovanadat
NIR	- naher Infrarotbereich (800 nm - 2500 nm)
Pellicle	- [lat.: pellicula → Häutchen] dünne Strahlteilerfolie
SNOM	- <i>Scanning Near-Field Optical Microscopy</i> (optische Nahfeldmikroskopie)
TAC	- <i>Time-to-Amplitude-converter</i>
TEM	- <i>Transverse Electromagnetic Mode</i>
TiO ₂	- Titandioxid
Ti:Sa	- Titan-dotierter Saphir
TPM	- Triphenylmethan
TCSPC	- <i>Time Correlated Single Photon Counting</i>
UPC	- <i>Up-Conversion</i>

Anhang B

Programme

Matlab-Programm zur Steuerung des Faltungsalgorithmus

```
function calculated = result

global frst
frst=1;

starting = [1000,0];

d_messwert = load('','-ASCII');
schrittweite = ;
d_apparate = load('','-ASCII');
app_schritt = ;
anpass_breite = 0; % fuer Glaettung hier Werte > 0

v_tau1 = 0; % Vorgabe fuer tau, wenn 0 automatische Anpassung
v_tau2 = 0;
v_tau3 = 0;

ordnung = 1; % 1 conv(tau_1) # 2 conv(tau_1 - tau_2) # 3 conv(tau_1 + tau_2 - tau_2)

% Anpassungsintervall für Chi-Quadrat festlegen
anp_be = 75; % Beginn Kanal Anpassung
anp_en = 0; % 0 fuer gesamten Bereich

% Messwerte zur Anpassung nach rechts (positive werte) links (negative werte) schieben
an_verschieb = 'p'; % 'p' fuer parametrische Anpassung

% Anpassung Maximum der gerechneten Funktion mit Maximum Messwerte
max_anp = 'a'; % Wert fuer Vorgabe # 'a' fuer automatische # 'p' fuer parametrische Anpassung
fenster_an = 180;
fenster_en = 200;

% Subtraktion Sockel der Messfunktion
offset_vorgeben = 'a'; % Vorgabe Untergrund # 'a' fuer automatisch im Bereich laenge_mittel_laenge
% 'p' fuer parametrische Anpassung
laenge_mittel_beginn = 1; % wenn >0 dann automatische Mittelung im Startbereich
laenge_mittel_laenge = 5; % Laenge zur Ermittlung der Null

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

anzeige = input('0 zum Abtesten\n1 nur Werte\n2 * Kurven anzeigen\n3 Kurven speichern\n-> ');
% 0 zum Abtesten
% 1 nur Werte
% 2 * Kurven anzeigen
% 3 Kurven speichern
if isempty(anzeige)
    anzeige = 2;
end;

mach_min = input('0 zum Anzeigen der Werte\n1 * suchen des Minimums\n-> ');
% 0 Nur Werte anzeigen
% 1 * Minimum suchen
if isempty(mach_min)
    mach_min = 1;
end;

if anzeige==0;mach_min=0;end;

% Ausgabe der Parameter

if anzeige >= 3
    fprintf('schrittweite = %g\n',schrittweite);
    fprintf('app_schritt = %g\n',app_schritt);
    fprintf('anpass_breite = %g\n',anpass_breite);
    fprintf('ordnung = %g\n',ordnung);
```

```

end;

% Hier gegebenenfalls Glatte wenn anpass_breite > 0
if anpass_breite > 0
    gt = 0;
    for w_x=anpass_breite+1:schrittweite/app_schritt:length(d_apparate)-anpass_breite,
        c_x = [-anpass_breite:anpass_breite]';
        d_x = d_apparate(w_x-anpass_breite:w_x+anpass_breite);
        p_x = polyfit(c_x,d_x,2);
        gt=gt+1;
        K(gt) = polyval(p_x,0);
    end;
    K = K - min(K);
    d_apparate = K';
elseif anpass_breite == 0
    gt = 0;
    for w_x=1:schrittweite/app_schritt:length(d_apparate),
        gt=gt+1;
        K(gt) = d_apparate(w_x);
    end;
    K = K - min(K);
    d_apparate = K';
end;

if mach_min == 1
    fun = @entfaltungs_funktion; % Funktionshandle zuweisen
    options = optimset('fminsearch');
    calculated = fminsearch(fun, starting, options, ordnung,schrittweite, d_messwert,
        d_apparate,anp_be,anp_en,an_verschieb,fenster_an,fenster_en,max_anp,laenge_mittel_beginn,
        laenge_mittel_laenge,offset_vorgeben,v_tau1,v_tau2,v_tau3,1);
    entfaltungen_funktion(calculated, ordnung,schrittweite, d_messwert,d_apparate,anp_be,anp_en,
        an_verschieb,fenster_an,fenster_en,max_anp,laenge_mittel_beginn,laenge_mittel_laenge,
        offset_vorgeben,v_tau1,v_tau2,v_tau3, anzeige)
elseif mach_min == 0
    entfaltungen_funktion(starting, ordnung,schrittweite, d_messwert, d_apparate,anp_be,anp_en,
        an_verschieb,fenster_an,fenster_en,max_anp,laenge_mittel_beginn,laenge_mittel_laenge,
        offset_vorgeben,v_tau1,v_tau2,v_tau3, anzeige)
end;

```

Matlab-Programm des Faltungsalgorithmus

```

function fct = entfaltungen_funktion(params,ordnung,schrittweite,d_messwert,d_apparate,anp_be,
    anp_en,an_verschieb,fenster_an,fenster_en,max_anp,laenge_mittel_beginn,
    laenge_mittel_laenge,offset_vorgeben,v_tau1,v_tau2,v_tau3,anzeige);

global frst
param_verschieb = 1;

% Parameterübergabe
if ordnung >= 1
    if v_tau1 == 0
        if frst; fprintf('Parameter %g = tau_1\n', param_verschieb);end;
        tau_1 = params(param_verschieb);
        param_verschieb = param_verschieb + 1;
    else
        if frst; fprintf('Vorgabe tau_1 = %d\n', v_tau1);end;
        tau_1 = v_tau1;
    end;
end;
if ordnung >= 2
    if v_tau2 == 0
        if frst; fprintf('Parameter %g = tau_2\n', param_verschieb);end;
        tau_2 = params(param_verschieb);
        param_verschieb = param_verschieb + 1;
    else
        if frst; fprintf('Vorgabe tau_2 = %d\n', v_tau2);end;
        tau_2 = v_tau2;
    end;
end;
if ordnung >= 3
    if v_tau3 == 0
        if frst; fprintf('Parameter %g = tau_3\n', param_verschieb);end;
        tau_3 = params(param_verschieb);
        param_verschieb = param_verschieb + 1;
    else
        if frst; fprintf('Vorgabe tau_3 = %d\n', v_tau3);end;
        tau_3 = v_tau3;
    end;
end;
end;

```

ANHANG B. PROGRAMME

```
% Messwerte zur Anpassung nach links (negative werte) schieben
if an_verschieb == 'p'
    if frst; fprintf('Parameter %g = Verschiebung Messwerte nach (-) links
                    oder (+) rechts\n', param_verschieb);end;
    an_verschieb = params(param_verschieb);
    param_verschieb = param_verschieb + 1;
end;

% Anpassung Maximum der gerechneten Funktion mit Maximum Messwerte
if max_anp == 'p'
    if frst; fprintf('Parameter %g = Anpassung an Maximum der Messwerte\n',
                    param_verschieb);end;
    max_anp = params(param_verschieb);
    param_verschieb = param_verschieb + 1;
end;

% Subtraktion Sockel der Messfunktion
if offset_vorgeben == 'p'
    if frst; fprintf('Parameter %g = Anpassung an Untergrund\n',
                    param_verschieb);end;
    offset_vorgeben = params(param_verschieb);
    param_verschieb = param_verschieb + 1;
end;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
d_mess_lang = d_messwert;

schritt = schrittweite * 200000000 /299792458;

t = 1:schritt:4000*schritt;

if ordnung == 1
    rech_faltung = conv(exp(-t/tau_1),d_apparate);
elseif ordnung == 2
    rech_faltung = conv(exp(-t/tau_1)-exp(-t/tau_2),d_apparate);
elseif ordnung == 3
    rech_faltung = conv(exp(-t/tau_1)+exp(-t/tau_2)-exp(-t/tau_3),d_apparate);
end;

rech_faltung = rech_faltung';

if anzeige == 0
    figure(3);subplot(3,1,1);plot(rech_faltung);hold on;plot(d_messwert,'r');
    holdoff
end;

% Subtraktion Sockel der Messfunktion
if offset_vorgeben == 'a'
    dunkelcounts = mean(d_messwert(laenge_mittel_beginn:
                                laenge_mittel_beginn+laenge_mittel_laenge));
else
    dunkelcounts = offset_vorgeben;
end;
d_mess_lang = d_mess_lang - dunkelcounts;
d_messwert = d_messwert - dunkelcounts;

% Anpassung Maximum der gerechneten Funktion mit Maximum Messwerte
if max_anp == 'a'
    rech_faltung = rech_faltung/max(rech_faltung)*
                    mean(d_messwert(fenster_an:fenster_en));
else
    rech_faltung = rech_faltung/max(rech_faltung)*max_anp;
end;

% Aus negativem Bereich hochschieben
if min(d_messwert) < 0
    rech_faltung = rech_faltung - min(d_messwert) +1;
    d_mess_lang = d_mess_lang - min(d_messwert) +1;
    d_messwert = d_messwert - min(d_messwert) +1;
end;

if anzeige == 0
    figure(3);subplot(3,1,2);plot(rech_faltung);
    hold on;plot(d_messwert,'r');holdoff
end;

% Meßwerte lang abspeichern
rech_falt_lang = rech_faltung;

% Messwerte zur Anpassung nach links (negative werte) schieben
an_verschieb = round(an_verschieb);
if an_verschieb < 0
    d_messwert(1:(-1)*an_verschieb)=[];
elseif an_verschieb > 0
    rech_faltung(1:an_verschieb)=[];
end;

if anzeige == 0
    figure(3);subplot(3,1,3);plot(rech_faltung);
    hold on;plot(d_messwert,'r');holdoff
end;

% Matrixlaenge anpassen
if length(rech_faltung) > length(d_messwert)
```

```

rech_faltung=rech_faltung(1:length(d_messwert));
elseif length(rech_faltung) < length(d_messwert)
d_messwert=d_messwert(1:length(rech_faltung));
end;

% Anpassungsintervall festlegen
if anp_en == 0
    anp_en = length(rech_faltung);
end;
d_messwert = d_messwert(anp_be:anp_en);
rech_faltung = rech_faltung(anp_be:anp_en);
error_vector = (d_messwert - rech_faltung).^2./(d_messwert+dunkelcounts);
error_pl = (d_messwert - rech_faltung)./sqrt(d_messwert+dunkelcounts);
stand_abw = (d_messwert - rech_faltung);
stand_abw_qu = sqrt((d_messwert - rech_faltung).^2);
beg_his = 5*ceil(max(stand_abw_qu)/5);
if beg_his > 10000;beg_his=10000;end;
v_ber = -beg_his :5:beg_his;

% Direkte Anzeige
if (anzeige >= 2)
    figure(1)
    subplot(2,1,1);
    plot(error_pl,'*')
    subplot(2,1,2);
    plot(d_messwert,'o')
    hold on
    plot(rech_faltung,'r')
    hold off
    figure(2)
    hist(stand_abw,v_ber)
end;

% Ausgabe Datei
if (anzeige == 3)
    fprintf('anp_be      = %g\n',anp_be);
    fprintf('anp_en      = %g\n',anp_en);
    fprintf('an_verschieb = %g\n',an_verschieb);
    fprintf('fenster_an     = %g\n',fenster_an);
    fprintf('fenster_en     = %g\n',fenster_en);
    fprintf('max_anp       = %g\n',max_anp);
    fprintf('laenge_mittel_beginn = %g\n',laenge_mittel_beginn);
    fprintf('laenge_mittel_laenge = %g\n',laenge_mittel_laenge);
    fprintf('offset_vorgeben = %g\n',offset_vorgeben);
    save('ausg_data.dat','-ASCII','d_messwert');
    save('ausg_data_long.dat','-ASCII','d_mess_lang');
    save('ausg_gerech_fkt.dat','-ASCII','rech_faltung');
    save('ausg_gerech_fkt_long.dat','-ASCII','rech_falt_lang');
    save('ausg_residuen.dat','-ASCII','error_pl');
    [hi_y,hi_x] = hist(stand_abw,v_ber);
    hi_sav = [hi_x,hi_y'];
    save('ausg_histogramm_std_abweichung.dat','-ASCII','hi_sav');
end;

if frst == 1
    frst = 0;
end;

fct = sum(error_vector)/(anp_en-anp_be+1-ordnung);

```

Anhang C

Benutzte Hilfsmittel

- Literatursuchdienst *ISI Web of Science*
- Literatursuchdienst *Scifinder*
- Programmumgebung MATLAB
- Programmumgebung Mathematica

Anhang D

Veröffentlichung

68. Physiker- und AMOP-Frühjahrstagung München 2004:

S. Bleil, D. Otteken and K. Maier. Femtosecond Fluorescence Analysis with Confocal Two-Photon Excitation. *Verhandl. DPG*, (VI) 39, Q 20.18 (2004)

Lebenslauf

Stefan Bleil

Geboren am 23. Februar 1971 in Braunschweig

08/1977–07/1981
Grundschule Broitzem
Braunschweig

08/1981–07/1983
Orientierungsstufe Rothenburg
Braunschweig

08/1983–07/1991
Gymnasium Martino-Katharineum
Braunschweig

10/1991–09/1992
Grundwehrdienst in Braunschweig und Munster

10/1992–04/1995
Vordiplom Physik an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg

05/1995–08/2000
Diplom im Studiengang Physik an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg
(Thema der Diplomarbeit: *Spektroskopische online-Analyse von Proben für das MALDI-Verfahren*)

09/2000–10/2004
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physik an der Carl-von-Ossietzky
Universität Oldenburg.

11/2001–03/2002
Mitarbeit im Projekt E-Learning el3.

09/2002–11/2002
09/2003–11/2003
Lehrtätigkeit in der Ammerland-Klinik Westerstede.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfaßt und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.



Stefan Bleil

23. Dezember 2005