

III. Apparative Beschreibungen und Auswertemethoden

III.1. Das Lasersystem

In diesem Kapitel werden die verwendeten Lasersysteme zur Erzeugung von Pulsen im ps Zeitbereich, deren Eigenschaften und die für den Meßaufbau notwendigen Modifikationen beschrieben. Das Lasersystem bestimmt wesentlich die Eigenschaften der im Zusammenhang mit dieser Arbeit aufgebauten Meßapparatur zur Bestimmung transienter Absorptionsspektren und die Eigenschaften der Apparatur zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung.

Zur Verfügung standen zwei Farbstofflaser (Typ Spectra Physics 375) mit *cavity dumper* (Typ Spectra Physics 344S), die mit einem modengekoppelten Hochleistungs- Argon- Ionen-Laser (Spectra Physics 2045-15) mit Modenkoppler (Spectra Physics 342A) gepumpt werden.

III.1.1 Modengekoppelter Argon-Ionen-Laser

Der als Pumplaser verwendete Argon-Ionen-Laser (Argonlaser) nutzt als aktives Lasermedium ein Argonplasma, das ein typisches 4-Niveau Laserübergangsschema aufweist und der 4p-4s Übergang von Ar^+ der genutzte Laserübergang ist. Das 4p- und das 4s-Niveau spalten sich in weitere Subniveaus auf, die zu Emissionslinien von 400 nm bis 600 nm führen. Die intensivste Übergangslinie liegt bei 514.5 nm, die durch ein dispersives Element in der Laser-cavity gezielt verstärkt wird (single line Modus). Die Ausgangsleistung im cw-Betrieb bei 514.5 nm beträgt 7 W [Spectra Physics (1989)]. Da der Argon-Ionen-Laser zum synchronen Pumpen von Farbstofflasern zur Erzeugung von Pikosekundenpulsen dient, muß dieser selbst kurze Pulse erzeugen. Dies wird durch einen Modenkoppler erreicht. Dabei werden die longitudinalen Moden des Lasers dazu gebracht, in einer festen Phasenbeziehung zueinander zu bleiben. Das Resultat ist ein sich in dem Laserresonator bewegendes Lichtpaket, das durch einen teildurchlässigen Spiegel ausgekoppelt wird. Das Modelocking wird durch die Modulation der Verluste innerhalb der Cavity mit Hilfe eines akustooptischen Modulators erreicht, dessen Frequenz mit der Umlaufzeit eines Pulses innerhalb des Laserresonators synchronisiert ist ($\nu=c/2l$). Dies ist die Frequenzdifferenz zweier benachbarter longitudinaler Moden [Spectra Physics (1987a)]. Je mehr Moden miteinander gekoppelt sind, desto kürzer wird der zu erzeugende Puls. Demnach hängt die untere Grenze der Pulsbreite von der energetischen Breite des Laserüberganges ab. Pulse, die diesen Grenzwert erreichen, bezeichnet man als fourierlimitiert.

Mit dem vorhandenen Argonlasersystem können Pulse mit einer Breite von <100 ps FWHM mit einer Wiederholrate von 82 MHz erzeugt werden. Die Pulse werden über eine schnelle Photodiode (Antel AR-S2, Halbwertsbreite < 65 ps) und einem Sampling Oscilloscope (Tektronix 11801) detektiert und als Monitor für die Pulsqualität⁹ und die Laserjustage¹⁰ genutzt.

III.1.2 Farbstofflaser mit Cavitydumper

Der modengekoppelte Argonlaser dient zum synchronen Pumpen zweier Farbstofflaser. Farbstofflaser haben im Gegensatz zu Gas- und vielen Festkörperlasern den Vorteil der kontinuierlichen Durchstimbarkeit der Wellenlänge, die für einen gegebenen Farbstoff und einen Laserspiegelsatz ca. 100 nm beträgt. An die Farbstoffe werden die Anforderungen einer hohen Absorption bei der Pumpwellenlänge¹¹ und einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute über einen breiten Spektralbereich gestellt [Drexhage (1977)]. In dieser Arbeit wird ausschließlich der Farbstoff DCM¹² (Laserbereich 612-721 nm) verwendet. In Kombination mit einem Spiegelsatz, der mit seinen Reflexionseigenschaften am besten mit dem Farbstoff übereinstimmt, wird ein Wellenlängenbereich von 615 nm bis 710 nm abgedeckt.

Für die Einstellung einer Wellenlänge sind wellenlängenselektive Elemente innerhalb des Resonators des Farbstofflasers notwendig. In den beiden Farbstofflasern kommen unterschiedliche wellenlängenselektive Elemente zum Einsatz, die als Folge eine unterschiedliche spektrale Bandbreite ergeben. So wird in dem Farbstofflaser, der als Testlaser für die transiente Absorptionsanlage und als Anregungslaser für die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen genutzt wird, ein Fabry-Perot Etalon eingesetzt. Dessen spektrale Bandbreite beträgt 240 GHz, was bei 650 nm 0.3 nm entspricht. Der freie Spektralbereich des Fabry-Perot Etalons ist sehr groß (>100000 GHz). Im zweiten Farbstofflaser – Pumplaser in der transienten Absorptionsanlage – ist ein doppelbrechender Lyotfilter, bestehend aus drei Quarzplatten, mit einer spektralen Bandbreite von 40 GHz (0.05 nm bei 650 nm) eingebaut. Der freie Spektralbereich beträgt aber nur 65000-85000 GHz [Spectra Physics (1987b)], was dazu führt, dass dieser Laser einen kleineren Spektralbereich (620-700 nm) als der sonst identische Farbstofflaser mit dem Etalon abdeckt.

Das Pumpen eines Dauerstrich-Farbstofflasers, dessen Resonatorlänge mit der des Pumplasers übereinstimmt, führt zu einer Übertragung der Modenkopplung über die Modulation der Pumpintensität auf die Farbstofflaser und wird synchrones Pumpen genannt. Es entstehen

⁹ Pulsbreite und Stabilität.

¹⁰ Z. B. Anpassen der Resonatorlänge an die Modelockerfrequenz.

¹¹ Hier 514.5 nm.

¹² 4-Dicyanomethylene-2-methyl-6-(p-dimethylaminosyryl)-4H-pyran (DCM); 0.49 g/l in 20 % Benzylalkohol und 80 % Ethylenglykol.

Pulse der Länge von ≥ 1 ps, welche synchron zu denen des Pumplasers sind, d. h. es entstehen Pulse mit der Wiederholrate des Argonlasers, und sie stehen in einem festen zeitlichen Verhältnis zu den Pumpimpulsen [Shank und Ippen (1977)].

Dieses System würde zwar zu kurzen Pulsen führen, was aber eine sehr hohe Wiederholrate von in diesem Fall 82 MHz hätte. Das entspricht einer Zeit von 12.2 ns zwischen zwei Pulsen. Für die Messungen ist es notwendig, daß sich die Proben bei der Anregung in dem zu untersuchenden Grundzustand befinden. Die Relaxation der hier zu untersuchenden PS II Kernkomplexe in ihren Ausgangszustand ist aber im μ s- bis ms- Bereich. Dafür ist die Wiederholrate zu hoch. Auch ein Probenaustausch ist während dieser Zeit nicht möglich. Also muß die Wiederholrate gesenkt werden. Dies wird mit Hilfe eines *cavity dumpers* erreicht.

Cavity Dumping ist eine Methode zur Erzeugung energiereicher Laserpulse durch Abzweigen eines Teils der Energie, die in einem geschlossenen Laserresonator gespeichert ist. Das Prinzip entspricht einem Intraresonator- Pulspicker, der nur die Pulse mit einer gewünschten Wiederholrate aus dem Resonator lenkt¹³ [Spectra Physics (1986)]. Der *cavity dumper* selbst besteht aus einem Piezokristall, auf dem ein Quarzkristall aufgeklebt ist. Ein RF-Puls mit einer Trägerfrequenz von weit über der Pulsumlauffrequenz an den Piezokristall erzeugt Ultraschallwellen, die auf den Quarzkristall übertragen werden und dort zu Änderungen im Brechungsindex führen. Dadurch wird ein Gitter im Quarz aufgebaut, das im Braggregime – d. h. die Bedingungen für eine Braggreflexion sind eingestellt¹⁴ – und im *traveling wave* Modus – d. h. die angelegte RF-Frequenz ist nicht in Resonanz mit dem Quarzkristall – zur Auslenkung des Laserpulses aus dem Resonator führt (Braggzelle). Der RF-Puls wird in einem Treiber zum *cavity dumper* erzeugt. Die hohe RF-Trägerfrequenz ist notwendig, damit einerseits die kurzen Pulse moduliert werden können und andererseits ein großer Brechungswinkel in der Braggzelle θ_d erreicht wird¹⁵ [Svelto (1998)]. Die Arbeitsweise und die Synchronisation des Treibers mit den im Resonator umlaufenden Lichtpulsen sind in Zaal (1982) und im Abschnitt III.1.4 noch einmal näher beschrieben. Das Cavity Dumping führt zu Pulsen, die bis zu 35 mal intensiver sind als Pulse, die über einen Auskoppelspiegel ausgekoppelt werden und dann noch nachträglich in der Wiederholrate gesenkt werden müssen. Da der Resonator mit *cavity dumper* geschlossen ist, werden auch schwache Moden und Rauschsignale verstärkt, was zu einer Verbreiterung der Pulse gegenüber dem synchron gepumpten Farbstofflaser ohne *cavity dumper* führt. Typische Halbwertsbreiten für die erzeugten Pulse des Farbstofflasers

¹³ Ca. 40 % der Intraresonator-Pulsenergie.

¹⁴ Siehe unten.

¹⁵ $\theta_d = \lambda / \lambda_a$, mit λ_a -Wellenlänge der akustischen Welle und λ - Wellenlänge des Laserpulses.

mit *cavity dumper* liegen bei 7-9 ps, d. h. durch die Interaktion der Pulse in der Braggzelle wird die Pulsbreite vergrößert.

Mit dem *cavity dumper* kann die Wiederholrate variabel von 80 kHz bis 4 MHz eingestellt werden, wobei die Pulsenergie der Farbstofflaser in der Größenordnung von 10-50 nJ liegt.¹⁶

III.1.3 Synchronisation der Farbstofflaser, Pulseigenschaften

Für die Messung transienter Absorptionssignale ist eine genau definierte Zeitdifferenz zwischen dem Pump- und dem Testpuls notwendig. Da die aufzubauende transiente Absorptionsanlage die Möglichkeit von zwei-Farben Pump- Probe Absorptionsmessungen – d. h. die Probe wird mit einer Wellenlänge angeregt und mit einer zweiten Wellenlänge unabhängig von der ersten abgefragt – haben soll, war es notwendig, zwei Farbstofflaser parallel zu betreiben.

Die beiden Farbstofflaser werden zeitgleich durch den modengekoppelten Argonlaser gepumpt. Da die Resonatorlängen der beiden Farbstofflaser auf die Pumpfrequenz des Argonlasers abgestimmt sind¹⁷, ist die Umlauffrequenz der Farbstofflaserpulse im Resonator, die durch dessen Länge vorgegeben ist, in beiden Farbstofflasern identisch. Die Pulse der beiden Farbstofflaser sind damit optisch synchronisiert [Jain und Heritage (1978), Clemens et al.(1983)]. Notwendig ist auch das gleichzeitige Auskoppeln der Pulse aus den beiden Farbstofflasern durch die *cavity dumper*. Deshalb ist eine Synchronisation der *cavity dumper* Treiber notwendig.¹⁸

Im einfachsten Fall können beide *cavity dumper* Treiber extern getriggert werden, um das gleichzeitige Auskoppeln der Pulse zu ermöglichen. Experimente zeigen jedoch, daß trotz Synchronisation der Auskoppelzeitpunkt der Pulse beider Farbstofflaser teilweise bis zu 100 ns auseinander liegt. Dies kann zum Teil an den unterschiedlichen elektronischen Laufzeiten in den beiden *cavity dumper* Treibern liegen. Hauptanteil an der Zeitdifferenz der beiden Auskoppelzeitpunkte hat jedoch die Laufzeit der akustischen Welle in der Braggzelle. Unterscheidet sich der Abstand zwischen dem elektro-akustischen Transducern (Piezokristall) und dem Lichtstrahl in der Braggzelle um nur 0.5 mm, ergibt sich eine Laufzeitdifferenz der akustischen Welle und damit des Auskoppelzeitpunktes von 75 ns.¹⁹ Da eine so exakte Justage der Braggzelle in den Farbstofflasern unpraktikabel, wenn nicht unmöglich ist, wird eine Synchronisationseinheit mit integrierter elektronischer Verzögerung benötigt, die im Abschnitt III.1.4 beschrieben ist.

¹⁶ Sie ist natürlich abhängig von der Pumpenergie, der Emissionswellenlänge und der Wiederholrate.

¹⁷ Siehe oben.

¹⁸ Vgl. Brock (1987).

¹⁹ Zur Berechnung wurde die Schallgeschwindigkeit in Quarz von $3.76 \cdot 10^4$ m/s verwendet.

Charakterisierung der Farbstofflaserpulse

Eine Möglichkeit der Charakterisierung von schnellen Pulsen ist die Messung der Autokorrelation. Dabei wird der Puls in zwei Teile aufgespalten und über ein Fabry Perot Interferometer mit variabler Armlänge in einen nichtlinearen Kristall²⁰ geleitet, um dort die Summenfrequenz²¹ aus beiden Teilen zu erzeugen. Die Summenfrequenz bildet sich nur bei einem räumlichen und zeitlichen Überlapp im Kristall heraus. Zusätzlich muß noch eine Phasenanpassung des Kristalls über den relativen Winkel der Kristallachse zu den Pulsen stattfinden, da neben der Energie- auch die Impulserhaltung gilt:

$$1/\lambda_{\Sigma} = 1/\lambda_1 + 1/\lambda_2 \quad \text{Energieerhaltung} \quad \text{(III-1)}$$

$$k_{\Sigma} = k_1 + k_2 \quad \text{Impulserhaltung} \quad \text{(III-2)}$$

mit λ_{Σ} Wellenlänge der Summenfrequenz; $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda$ Wellenlänge der aufgeteilten Laserpulse; k_{Σ} , k_1 , k_2 Wellenvektor der jeweiligen Pulse.

Die Summenfrequenz wird dann von einem Photomultiplier in Abhängigkeit von der Verzögerungsstrecke detektiert.²² Dabei gilt für das Autokorrelationssignal:

$$I_{AK}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} I(t) * I(t + \tau) dt \quad \text{(III-3)}$$

mit $I(t)$ -zeitlicher Verlauf der Pulsintensität des Laserpulses und τ die relative Zeitverzögerung zwischen den Pulsen.

Das Signal ist symmetrisch um $\tau=0$ und dessen Halbwertsbreite hängt vom zeitlichen Verlauf $I(t)$ der Laserpulse ab. Im Falle einer zeitlich gaußförmigen Intensitätsverteilung ist die Halbwertsbreite der Autokorrelation um den Faktor $\sqrt{2}$ größer als die des Pulses. Der Einfachheit halber wird hier eine zeitliche gaußförmige Pulsform angenommen.

Die Autokorrelation wird zur optimalen Justage der Farbstofflaser, insbesondere der Anpassung der Resonatorlänge an die Pumpfrequenz des Argonlasers²³, genutzt. Wenn die Resonatorlänge der Farbstofflaser zu kurz ist, treten Nachpulse auf, die in der Autokorrelation vor und nach dem Hauptpuls zu erkennen sind (Symmetrie). Bei zu großer Resonatorlänge werden die Pulse breit und instabil.

²⁰ Z. B. Kalium-dihydrogenphosphat, KDP.

²¹ Zweite Harmonische.

²² Siehe Abbildung III-1.

²³ Siehe oben.

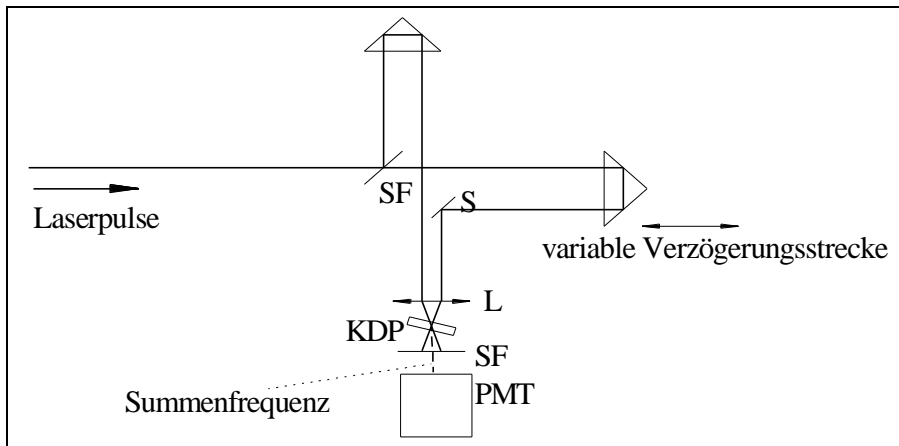


Abbildung III-1 prinzipieller Aufbau eines Autokorrelators

ST – Strahlteiler; L – Linse; KDP – nichtlinearer Kristall; S – Spiegel;
SF – Solar blind Filter; PMT – Photomultiplier als Detektor.

Coherent spike

Zusätzlich wird das Autokorrelationssignal überlagert von einem *coherent spike*, oder auch kohärenter Kopplungsartefakt genannt, einem nichtlinearen Effekt, der sich als schmale Spitze im Meßsignal zeigt und dessen Breite von der Kohärenzlänge des Lichtes abhängt.²⁴ Bei fourierlimitierten Pulsen führt dies zu einer Breite des *coherent spikes*, die der Breite der Autokorrelation entspricht und von dieser nicht unterschieden werden kann. Das Signal hat sein Maximum, wenn die beiden Teilpulse im Autokorrelator die Zeitverzögerung $\tau=0$ zueinander haben. Das Maximalsignal ist gleich dem der darunter liegenden Autokorrelation. Der wesentliche Mechanismus zur Entstehung des *coherent spike* ist der Austausch der Rollen des Pump- und des Testpulses während des zeitlichen Überlapps. Dieser Effekt führt zu einer Signalverstärkung. Die Signalverstärkung hängt wesentlich von der Polarisation und der Frequenz der beiden Teilpulse ab. Weiterhin ist dieser Effekt nicht auf die Autokorrelation beschränkt, sondern kann auch bei transienten Absorptionsexperimenten, bei denen Pump- und Testpuls aus der gleichen Quelle stammen, beobachtet werden, was zur erheblichen Komplizierung der Auswertung solcher Meßkurven im Bereich um den Zeitnullpunkt führt. Das Fehlen dieses Effekts verdeutlicht auch den Vorteil der Benutzung von zwei Laserquellen zur unabhängigen Erzeugung von Pump- und Testpuls selbst für Einfarbenexperimente.

Die Abbildungen III-2a und b zeigen die Autokorrelationskurven der Pulse der beiden Farbstofflaser. Deutlich zu sehen ist in a) die Autokorrelation überlagert mit einem *coherent spike*, der in b) fehlt. Wie oben erwähnt, sind in den beiden Farbstofflasern wellenlängenselektive Elemente mit unterschiedlichen spektralen Bandbreiten eingesetzt. Das Lyot Filter, das im Pumplaser im Einsatz ist, hat eine Bandbreite von ca. 40 GHz. Aus der Energie-Zeit-

²⁴ Siehe u. a. Shank und Ippen (1977); Laubereau (1988); Shank und Auston (1975).

Unschärferelation folgt ein fourierlimitierter Puls mit einer Halbwertsbreite von ca. 10 ps für gaußförmige Pulse.²⁵

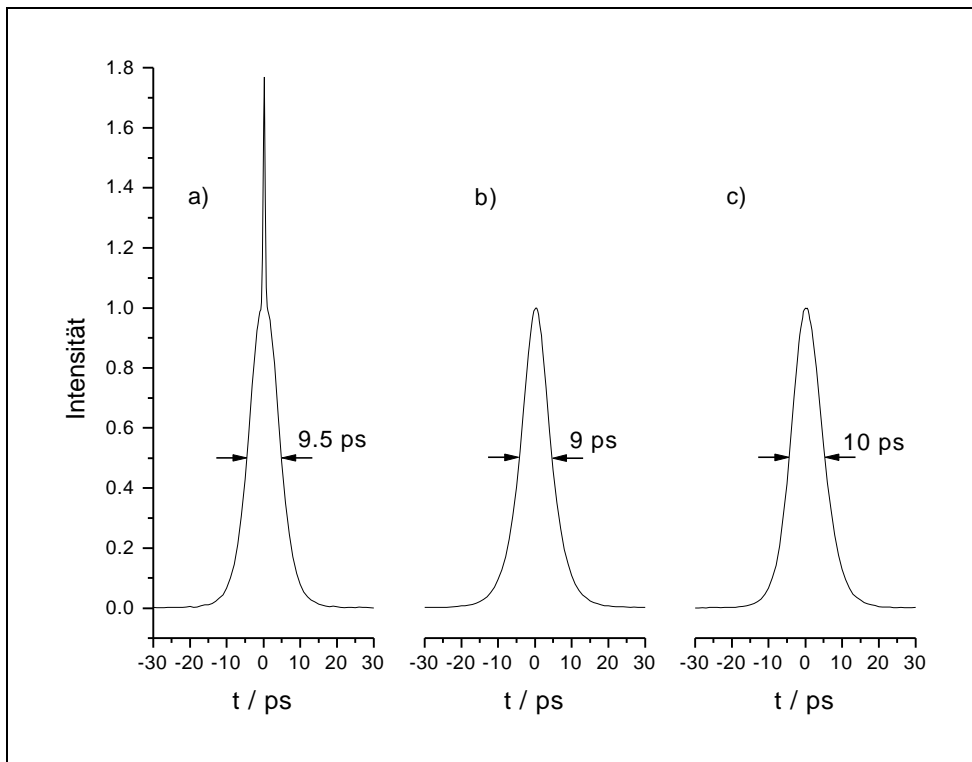


Abbildung III-2 Auto- und Kreuzkorrelation der beiden Farbstofflaser

- a) Autokorrelation des Testlasers (FWHM 9.5 ps)
- b) Autokorrelation des Pumplasers (FWHM 9 ps)
- c) Kreuzkorrelation zwischen Pump- und Testlaser.

Die Halbwertsbreite für den Pumplaser²⁶ bei Annahme eines gaußförmigen Pulses beträgt 7 ps, das heißt, dieser Puls ist transformationslimitiert. Für transformationslimitierte Pulse ist bekannt, daß der *coherent spike* die gleiche Breite wie die Autokorrelation besitzt und somit als solcher nicht auflösbar ist. Im Testlaser²⁷ ist ein Fabry-Perot Etalon mit einer spektralen Halbwertsbreite von 240 GHz im Einsatz, das transformationslimitiert auf eine Pulsbreite von 1.8 ps führen würde. Für den Puls wurde aber eine Breite von 6.5 ps gemessen²⁸, d. h. dieser Puls ist nicht transformationslimitiert. Hier ist der *coherent spike* deutlich ausgeprägt, mit einer Halbwertsbreite von ca. 1 ps. Diese Breite stimmt wiederum gut mit der eines transformlimitierten Pulses überein.

²⁵ Bei zeitlich gaußförmigen Pulsen gilt für die spektralen und der zeitlichen Halbwertsbreiten die Beziehung: $\Delta\nu \cdot \Delta t = 0.44$ [Diels und Rudolph (1996)].

²⁶ Siehe Abbildung III-2b.

²⁷ Siehe Abbildung III-2a.

²⁸ Gaußprofil vorausgesetzt.

Kreuzkorrelation

Die Pulsform und die Pulsbreiten des Pump- und des Testpulses gehen in die Kinetik eines transienten Absorptionsspektrums als Faltung mit einer theoretischen Kinetik mit δ -Puls Anregung ein. Die Autokorrelationskurven der beiden Laserpulse reichen als Information aus mehreren Gründen nicht aus:

- Die exakte Form der Pulse ist durch die Symmetrie des Autokorrelationssignals nicht bestimmbar.
- Der *coherent spike* verfälscht die Autokorrelationssignale um den Zeitnullpunkt.
- Der Zeitnullpunkt, definiert durch den optimalen zeitlichen Überlapp in der Probe, ist mit der Autokorrelation prinzipiell nicht bestimmbar. Er ändert sich u. a. durch das Durchstimmen der Farbstofflaser auf andere Wellenlängen oder sonstige Justage der Laser. Dadurch werden die Weglängen innerhalb des Laserresonators geändert und damit die zeitliche Relation der Lichtpulse beider Farbstofflaser.
- Trotz optischer Synchronisation der beiden Farbstofflaser treten durch zeitliche und Amplitudenschwankungen sowohl des Argonlasers als auch der Farbstofflaser Beeinflussungen der Synchronisation auf. Diese zeitliche Schwankungen zwischen beiden Pulsen sind nicht mit der Autokorrelation zu sehen. Sie treten auf durch Fluktuationen der Frequenz des Mode-Lockers, Instabilitäten der Resonatorlänge (Mikrophonie), Fluktuationen der Intensität des Pumplasers und die Bewegung des Farbstoffstrahls.

Diese Probleme können mit Hilfe der Methode der Kreuzkorrelation gelöst werden. Dabei werden ähnlich wie bei der Autokorrelation²⁹ die Pulse der beiden Laser über ein Fabry-Perot Interferometer mit variabler Armlänge zeitlich zueinander verzögert und in einem nichtlinearen Kristall³⁰ zum Überlapp gebracht.³¹ Bei räumlichem und zeitlichem Überlapp und nach Phasen Anpassung des nichtlinearen Kristalls wird die Summenfrequenz der beiden Laserpulse erzeugt, die detektiert wird. Für den Intensitätsverlauf der Kreuzkorrelation gilt näherungsweise:

$$I_{KK}(t) \propto \int I_1(t') * I_2(t'+t) dt' \quad \text{(III-4)}$$

mit $I_1(t')$ und $I_2(t')$ – Intensitätsverlauf der Pulse der beiden Farbstofflaser; t – relative Verzögerung der Pulse zueinander.

Das Maximum der Kreuzkorrelationsfunktion liegt beim optimalen zeitlichen Überlapp der beiden Pulse und definiert damit auch den zeitlichen Nullpunkt der Messung.

²⁹ Vgl. Abbildung III-1.

³⁰ Hier KDP.

³¹ Technischer Aufbau vgl. Abschnitt III.2.1.

Die Formel ist deshalb nicht ganz korrekt, weil sie die zeitlichen Schwankungen zwischen den beiden Lasern nicht berücksichtigt, die die Kreuzkorrelation insgesamt verbreitern. Für gaußförmige Lichtpulse und normalverteilte zeitliche Schwankungen ergibt sich für die Halbwertsbreite der Kreuzkorrelation τ_k die Beziehung [Clemens et.al. (1983)]:

$$\begin{aligned}\tau_k^2 &= \tau_1^2 + \tau_2^2 + \tau_N^2 \\ &= 0.5 * (\tau_{A1}^2 + \tau_{A2}^2) + \tau_N^2\end{aligned}\quad \text{(III-5)}$$

τ_k – Halbwertsbreite der Kreuzkorrelation; τ_1 – Halbwertsbreite vom Lichtpuls des Pumplasers;
 τ_2 – Halbwertsbreite vom Lichtpuls des Testlasers; τ_N – Halbwertsbreite der Rauschverteilung;
 τ_{A1} – Halbwertsbreite der Autokorrelation des Lichtpulses des Pumplasers; τ_{A2} – Halbwertsbreite der Autokorrelation des Lichtpulses des Testlasers.

Mit dieser Formel und den gemessenen Autokorrelationsbreiten kann eine Abschätzung des Einflusses zeitlicher Schwankungen der Laserpulse auf die Kreuzkorrelationsbreite und damit auch auf die zeitliche Auflösung der transienten Absorptionsanlage gemacht werden. Es ergibt sich für $\tau_{A1} = 9.5$ ps, $\tau_{A2} = 9$ ps und einer Kreuzkorrelationsbreite von $\tau_k = 10$ ps³² ein $\tau_N = 4$ ps. Die zeitlichen Schwankungen der Laserpulse zueinander sind damit klein und haben nur einen geringen Einfluß auf das Auflösungsvermögen der Apparatur zur Messung transienter Absorptionsspektren.³³

Der größte Vorteil der Kreuzkorrelation besteht allerdings darin, daß die Entfaltung einer gemessenen transienten Absorptionskinetik mit dem Kreuzkorrelationssignal im Prinzip die Absorptionskinetik eines mit einem Deltapuls angeregten und abgefragten Systems ergibt und damit die Zeitauflösung wesentlich verbessert werden kann.

Da – wie oben erwähnt – die Pulsform und der Zeitnullpunkt der Laserpulse sich bei Einstellen anderer Wellenlängen oder Justage ändern, wird die Kreuzkorrelationsfunktion bei jeder Messung mit aufgenommen.

III.1.4 Apparative Synchronisation der *cavity dumper* Treiber

Nachdem die Notwendigkeit der Synchronisation der beiden *cavity dumper* diskutiert und das Prinzip kurz erläutert wurde, soll nun näher auf die Funktionsweise und die apparative Synchronisation der *cavity dumper* Treiber eingegangen werden.³⁴

Der *cavity dumper* Treiber legt an die Braggzelle kurze RF-Pulse zu einer vorgegebenen Wiederholrate³⁵ an, die in der Braggzelle ein Brechungsindexgitter aufbauen und die modenkoppelten Laserpulse im Farbstofflaser aus dem Resonator lenken. Da die Umlauffrequenz

³² Siehe Abbildung III-2.

³³ Für $\tau_N = 0$ ps würde sich $\tau_k = 9$ ps ergeben.

³⁴ Vgl. Spectra Physics (1986).

der Laserpulse im Resonator 82 MHz beträgt, müssen die angelegten RF-Pulse kurz sein, um die Laserpulse selektiv auskoppeln und die Auskopplung der vorhergehenden und nachfolgenden Pulse unterdrücken zu können.

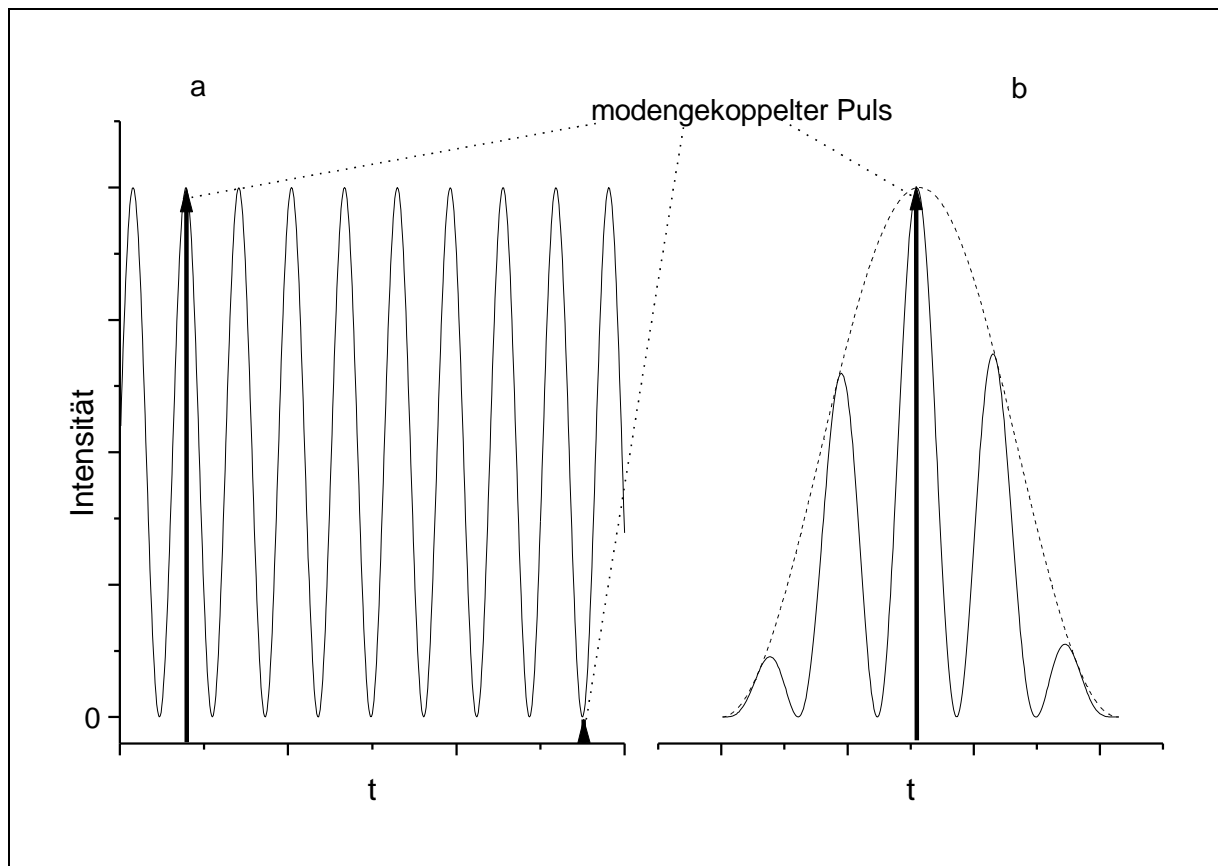


Abbildung III-3 *cavity dumper* Funktionsweise

- a) Prinzip der Integer + $\frac{1}{2}$ Technik, RF-*cavity dumper* Signal (—) im cw-Betrieb;
 b) Anpassung von Phase und Timing des RF-Pulses für die Auskopplung, das Timing bewegt die Umhüllende (-----) und Phase beeinflusst die Phasenlage des RF-Pulses (—).

Eine Methode zur Erhöhung der Selektivität der Pulsauskopplung ist die sogenannte *Integer + $\frac{1}{2}$ Technik*. Dabei beträgt die RF- Frequenz ein $(n + \frac{1}{2})$ –faches der Umlauffrequenz der Laserpulse. Ist also die Phase der anliegenden RF-Frequenz an der Braggzelle so optimiert, daß ein gewünschter Puls maximal ausgekoppelt wird, werden der vorherige und der nachfolgende Puls auf ein Modulationsminimum treffen und nicht ausgekoppelt, auch wenn der RF-Puls noch nicht vollständig abgeklungen ist.³⁵ Legt man statt eines RF-Pulses ein cw-RF-Signal mit dieser Frequenz an, so beträgt die Wiederholfrequenz der ausgekoppelten Pulse nicht 82 MHz sondern 41 MHz.

³⁵ 400 Hz – 4 MHz oder ein cw-RF-Signal.

³⁶ Siehe Abbildung III-3a.

Für die Reduzierung der Laserpulsfrequenz werden RF-Pulse in der gewünschten Wiederholrate an die Braggzelle angelegt.³⁷ Für die Optimierung der Auskopplung ist sowohl die Phase des RF-Signals als auch der Zeitpunkt des Pulses als Umhüllende des RF-Signals in einem Bereich von 15 ns stufenlos einstellbar.

Die Funktionsweise des *cavity dumper*-Treibers ist in Abbildung III-4 schematisch dargestellt. Die Pulse des Argonlasers werden als Referenzfrequenz über eine Photodiode detektiert und in einem festen Verhältnis auf die gewünschte Wiederholrate geteilt. Mit dieser Wiederholrate werden im Pulsgenerator kurze Pulse erzeugt, die multipliziert mit der RF-Frequenz von $(n + \frac{1}{2}) * 82 \text{ MHz}$ aus dem RF-Oszillator den gewünschten RF-Puls liefern, der dann verstärkt und an die Braggzelle angelegt wird. Dabei sind die Phase der RF-Frequenz am RF-Oszillator und der Zeitpunkt des Pulses am Pulsgenerator (Timing) zur Optimierung der Auskopplung stufenlos regelbar.

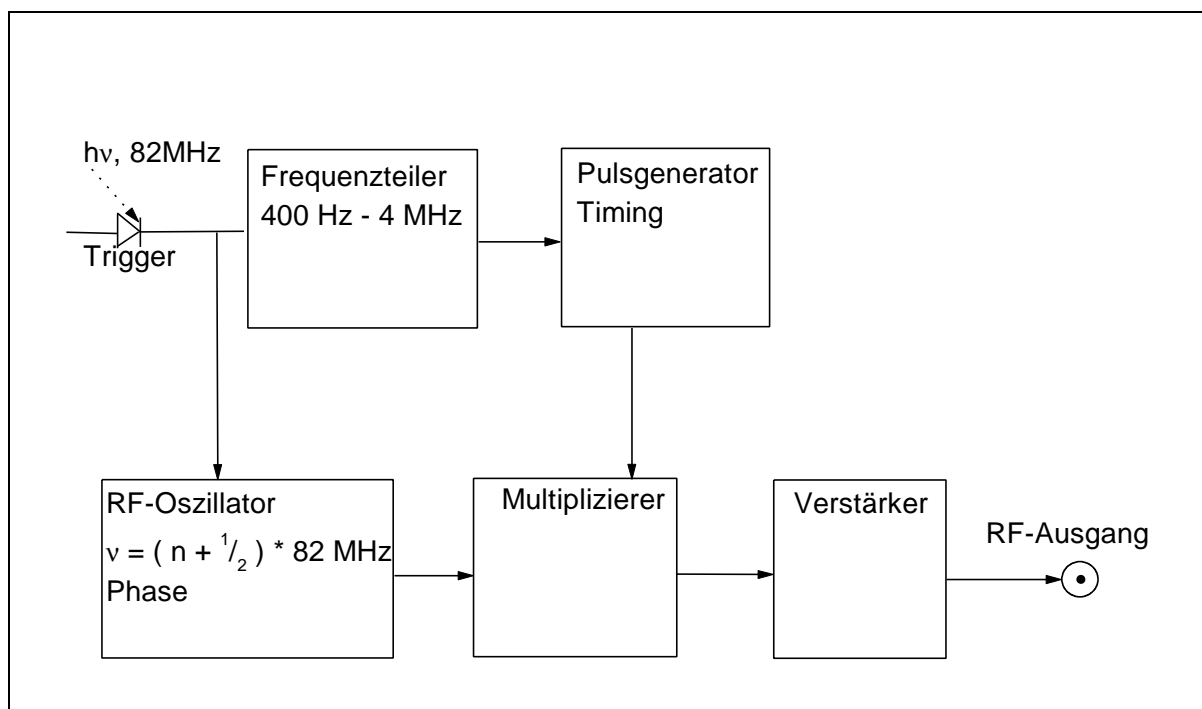


Abbildung III-4 Prinzipskizze des *cavity dumper* Treibers
(Erläuterung siehe Text).

Folgende Anforderungen sind an die Synchronisation der beiden *cavity dumper*-Treiber gestellt:

- Die RF-Pulse der *cavity dumper*-Treiber an die Braggzelle müssen in einem fest definierten zeitlichen Verhältnis stehen.

³⁷ Siehe Abbildung III-3b.

- Der zeitliche Abstand zwischen den RF-Pulsen der *cavity dumper*-Treiber und dementsprechend die Auskopplung der Laserpulse muß in 12.2 ns Schritten³⁸ wählbar sein.
- Für beide *cavity dumper*-Treiber müssen weiterhin die Feineinstellungen der Phase der RF-Frequenz und des Zeitpunktes des Pulses (Timing) am Pulsgenerator unabhängig voneinander möglich sein, um die Pulsauskopplung zu optimieren.

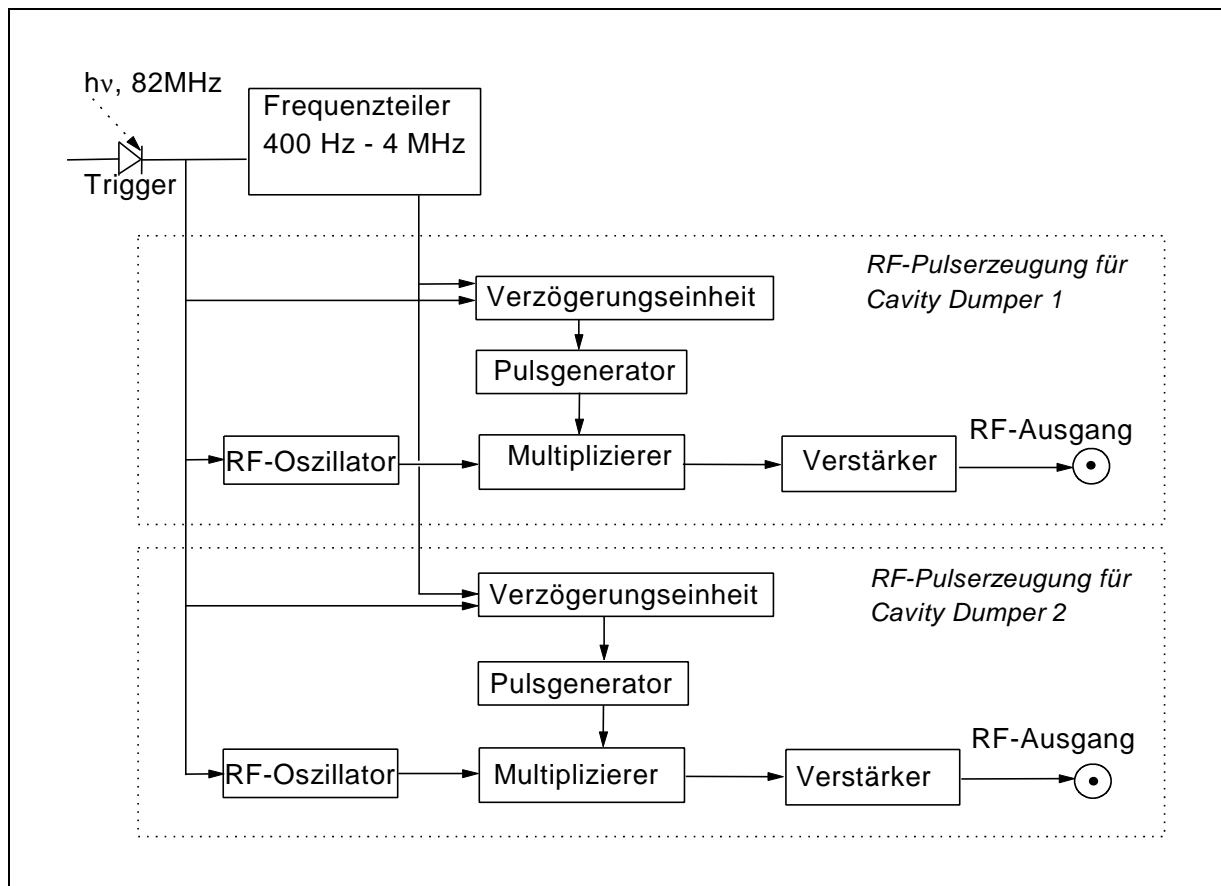


Abbildung III-5 Prinzipskizze der Modifizierung der *cavity dumper* Treiber.

Die beiden *cavity dumper*-Treiber dürfen also ihr Auskoppelsignal von nur einem Frequenzteiler erhalten. Dies kann mit einer Master-Slave-Konfiguration der beiden *cavity dumper*-Treiber gelöst werden. Dabei wird das Referenzsignal der Argonlaserpulse nur an den Frequenzteiler des Master *cavity dumper*-Treibers angelegt, der die Triggerpulse zur Pulsauskopplung an den Master und an den Slave leitet. Der Frequenzteiler des Slave *cavity dumper*-Treibers ist dabei deaktiviert. In dieser Konfiguration stehen die RF-Pulse und damit die Auskoppelzeiten der Laserpulse der beiden Farbstofflaser in einem festen Verhältnis. Um ein gleichzeitiges Auskoppeln der beiden Farbstofflaser zu ermöglichen und die Zeitunterschiede der Auskopplung von bis zu 100 ns durch im Wesentlichen Laufzeitunterschiede der akusti-

³⁸ Umlaufzeit der Laserpulse im Resonator.

schen Welle in der Braggzelle³⁹ zu korrigieren, müssen die Signale aus dem Frequenzteiler für einen der *cavity dumper*-Treiber variabel verzögert werden.

Um dem Umstand Rechnung zu tragen, daß der Puls aus dem Testlaser sowohl vor als auch nach dem des Pumpasers ausgekoppelt werden kann, müssen zwischen dem Frequenzteiler und den Pulsgeneratoren beider *cavity dumper*-Treiber Verzögerungseinheiten geschaltet werden, wie in Abbildung III-5 dargestellt. Die Verzögerungseinheit ist digital aufgebaut und verzögert die Triggersignale an die Pulsgeneratoren um ein vorgegebenes Vielfaches der reziproken Referenzfrequenz (12.2 ns), der Wiederholrate der Argonlaserpulse. Die digitale Verzögerung für den Pumpaser ist fest auf 10×12.2 ns eingestellt, die des Testlasers kann von 0 bis 255×12.2 ns frei gewählt werden. Eine Möglichkeit der Steuerung der Verzögerungszeit über eine serielle Schnittstelle ist auch gegeben.

Mit dieser Modifikation der *cavity dumper* Treiber ist das gleichzeitige Auskoppeln der Pulse aus dem Pump- und dem Testlaser gewährleistet. Weiterhin bietet es die Möglichkeit, Verzögerungszeiten zwischen Pump- und Testpuls bis zu $3 \mu\text{s}$ in 12.2 ns Schritten einzustellen, die mit einer optischen Verzögerungsstrecke nicht mehr erreicht werden können. Dabei ist zu beachten, daß aufgrund der sogenannten *Integer + 1/2* Technik⁴⁰ bei ungerader Schrittweite der Verzögerung erst die Phasenlage des RF-Pulses manuell am *cavity dumper*-Treiber um 180° gedreht werden muß.

III.2 Die Transiente Absorptionsanlage

Im folgenden wird die im Rahmen der Arbeit aufgebaute hochsensitive transiente Absorptionsanlage für zwei-Farben-Pump Probe Messungen im Pikosekundenzeitbereich vorgestellt werden. Wie in der Einleitung erwähnt, ist es für kinetische Messungen der Energie- und Elektronentransferschritte in photosynthetischen Systemen mit großen Antennen notwendig, mit sehr geringen Anregungsintensitäten ($\leq 2 \mu\text{J}/(\text{Puls} \cdot \text{cm}^2)$) zu arbeiten, um die Antenne eines Reaktionszentrums mit maximal einem Photon anzuregen. Bei Mehrfachanregung der Antenne innerhalb eines Pulses treten Annihilation der Exzitonen ($S_1 + S_1 \rightarrow S_0 + S_i$) oder Löschung von Exzitonen an P680^+ nach schon vollzogener Ladungstrennung als zusätzliche Löschanäle angeregter Zustände in Konkurrenz zu den photophysikalischen Prozessen auf, die hier beobachtet werden sollen. Mehrphotonenanregungen verfälschen somit die gemessene Kinetik.

³⁹ Siehe Absatz III.1.3.

⁴⁰ Siehe oben.

Bei derart niedrigen Anregungsintensitäten wird eine Absorptionsänderung in der Größenordnung von 10^{-3} erwartet. Um ein adäquates Signal/Rausch Verhältnis zu erreichen, muß das Rauschen in der Größenordnung von 10^{-4} (entspricht 0.1 mOD) liegen. Weiterhin ist eine unabhängige Wahl von Pump- und Test- Wellenlänge notwendig, um nicht nur die zeitlichen, sondern auch die spektralen Eigenschaften der angeregten Zustände der Probe zu charakterisieren. Damit sind die Grundanforderungen an die transiente Absorptionsanlage gestellt.

Es gibt zwei gleichberechtigte Herangehensweisen zum Aufbau derartiger Anlagen.

1. Es wird in einem Meßdurchgang das komplette Spektrum gemessen. Dazu wird durch einen kurzen, intensiven Lichtpuls in z. B. einer Wasserzelle ein sogenanntes Weißlichtkontinuum durch im Wesentlichen parametrischer Vierphotonenmischung [Clemens et.al. (1983)], Selbstphasenmodulation [Alfano et.al.(1972)] und stimulierter Ramanstreuung erzeugt, das einen mehrere hundert Nanometer breiten Spektralbereich abdeckt, als Testpuls genutzt und mit Hilfe von einem optischen Vielkanalanalysator detektiert.
2. Mit zwei unabhängig durchstimmbaren gepulsten Lichtquellen wird die Kinetik der angeregten Probe bei nur einer festen Wellenlänge für den Testpuls pro Meßzyklus gemessen. Spektren müssen daher aus mehreren Meßzyklen mit unterschiedlichen Test-Wellenlängen zusammengesetzt werden.

Methode 1 ist auf den ersten Blick günstiger, da die gesamte Information mit einem einzigen Meßzyklus zu erhalten ist und damit Zeit und Proben spart. Da aber intensive Laserlichtquellen, die ein Testpulscontinuum erzeugen können, nur niedrig repetitiv sind⁴¹, muß entweder die Anregungsintensität hochgesetzt werden, was für diese Messungen nicht akzeptabel ist, oder eine Einzelschußauswertung vorgenommen werden, um ein entsprechendes Signal/Rausch Verhältnis zu erreichen. Letzteres wurde schon technisch realisiert⁴², ist allerdings nur mit einem sehr hohen technischen und finanziellen Aufwand zu verwirklichen, der hier nicht zur Verfügung stand. Somit wurde die Realisierung der geforderten Bedingungen mit der zweiten Methode mit Hilfe des oben beschriebenen hoch repetitiven Lasersystems und mit der Technik der doppelten Modulation erreicht.

III.2.1 Der optische Aufbau

In Abbildung III-6 ist der optische Aufbau der transienten Absorptionsanlage skizziert. Die Grundlage der Anlage bilden die beiden synchron durch den modengekoppelten Argonlaser gepumpten Farbstofflaser mit Cavitydumper, die wiederum elektronisch synchronisiert sind. Die variable Verteilung der Pumpintensität des Argonlasers auf die Farbstofflaser geschieht

⁴¹ Bis zu einigen kHz Wiederholrate für verstärkte TiSa Systeme.

⁴² Vgl. z. B. Müller (1996).

durch ein $\lambda/2$ Plättchen (LA1), mit dem die Polarisation der Argonlaserpulse⁴³ variabel gedreht werden kann, und einen polarisierenden Strahlteilerwürfel (PS), der Pulse entsprechend dem Anteil der waagerechten und senkrechten Polarisation ihres elektrischen Feldes teilt. Das $\lambda/2$ Plättchen LA2 dreht die waagerechte Polarisation wieder um 90° .

Überwachung der Pulseigenschaften

Über die schnelle Photodiode PD1 kann wahlweise die Pulsqualität und Stabilität des Argonlasers und die der Farbstofflaser überwacht werden. Der rotierende-Prismen-Autokorrelator dient zur Einschätzung der Pulsform und -breite der Farbstofflaserpulse, die mittels Anpassung der Resonatorlänge an die des Argonlasers optimiert werden. Die Photodioden PD3 und PD4 haben eine Anstiegszeit von 1 ns und werden für die Überwachung der elektronischen Synchronisation der Cavity Dumper⁴⁴ und zur Kontrolle der Pulsmodulation über die akustooptischen Modulatoren⁴⁵ verwendet.

Erklärung der Abkürzungen des optischen Aufbaus in Abbildung III-6:

AL – Achromatische Linse	PD – Photodiode
ALa – achromatisches $\lambda/2$ Plättchen für 500-700 nm	PMT – Photomultiplier
AOM – akusto- optischer Modulator	PS – polarisierender Strahlteilerwürfel
B – Blende	RP – Retroprisma
CD – Cavity Dumper	S – Spiegel
DP – 120° -Dachkantprisma (Dach verspiegelt)	SF – UV-Bandpaßfilter (Schott UG 11)
F – Neutraldichtefilter	ST – Strahlteiler
FSL – Farbstofflaser	VF – variabler Neutraldichtefilter
KDP – nichtlinearer KDP-Kristall geschnitten für 600 nm	VS – variable Verzögerungsstrecke
L – Linse	
La – $\lambda/2$ Plättchen für 514 und 488 nm	

⁴³ Ursprünglich senkrecht polarisiert.

⁴⁴ Das gleichzeitige Auskoppeln aus beiden Farbstofflasern.

⁴⁵ Siehe unten.

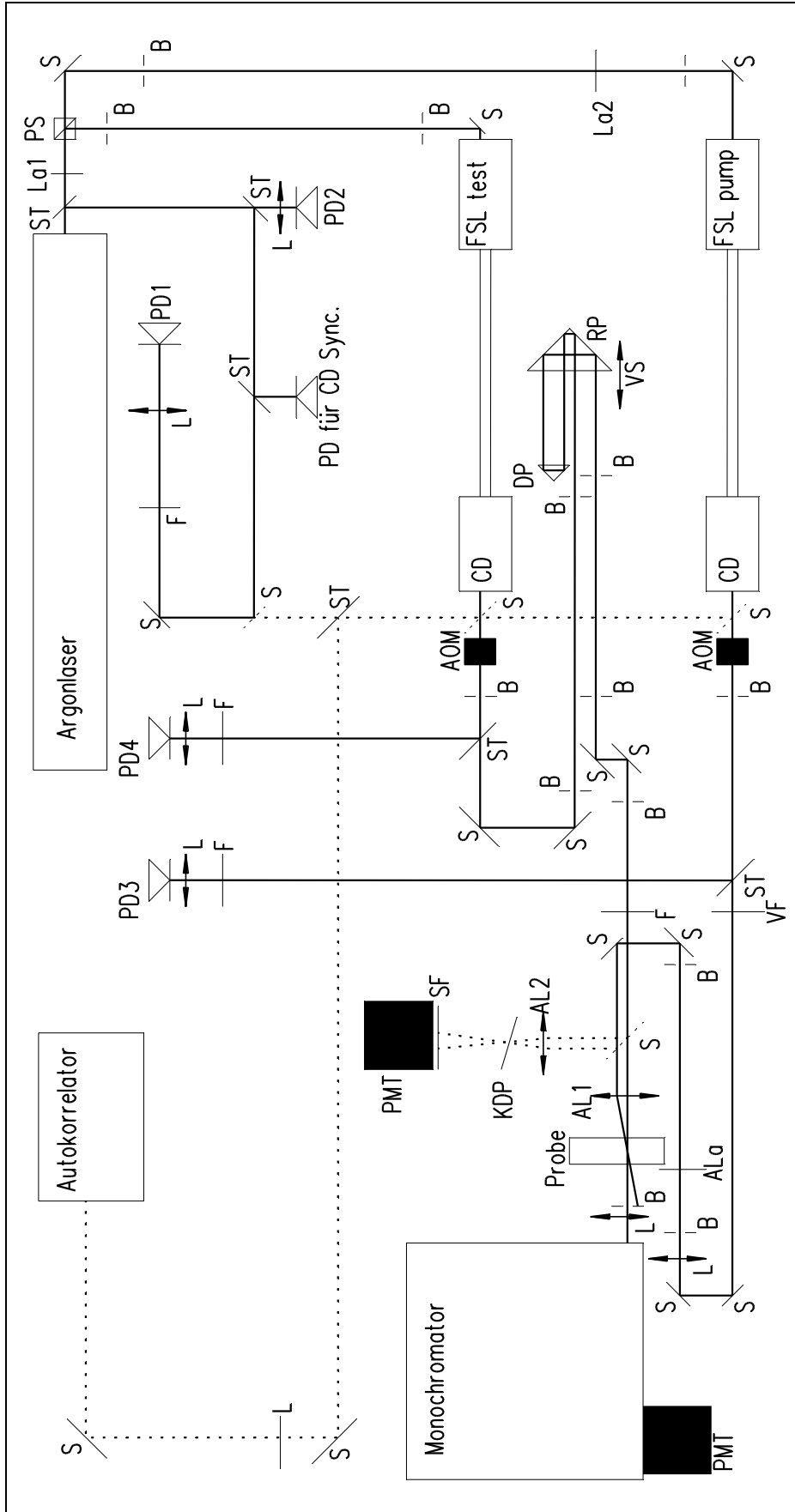


Abbildung III-6 Optischer Aufbau der transienten Absorptionsanlage

Die Verzögerungsstrecke

Um zeitaufgelöste Absorptionsspektren zu messen, ist es notwendig, den Testpuls variabel zum Pumpuls zu verzögern. Da im ps Zeitbereich keine elektronische Verzögerung möglich ist, wird die endliche Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes ausgenutzt, um durch eine Verkürzung oder Verlängerung der Wegstrecke s des Testpulses variable Verzögerungszeiten mit $t=s/c$ einzustellen. Hier wurde ein Präzisionslineartisch mit einer Länge von 30 cm, angetrieben von einem DC Motor mit Winkelencoder (PI M531-DG), eingesetzt. Die Verwendung von einfachen Prismen zur Strahlumlenkung erweist sich als nicht genau genug, um zu gewährleisten, daß der Teststrahl über eine solch lange Strecke keinen Strahlversatz aufweist. Mit dem Einsatz eines Retroprismas konnte das Problem gelöst werden. Die drei Rückflächen eines solchen Prismas („Katzenauge“) sind jeweils im Winkel von 90° zueinander angeordnet. So lassen sich Verzögerungsstrecken aufbauen, deren Justierung unempfindlich gegen die Verschiebung des bewegten Retroprismas ist. Unabhängig von der Lage des Prismas laufen bei einfachem Strahldurchlauf ein- und ausfallender Strahl parallel zueinander. Da Pump- und Testpuls parallel auf die achromatische Linse AL1 treffen und sich in deren Brennpunkt überlappen, wäre durch diese Korrektur der Ort des Strahlüberlapps konstant. Da aber auch bei achromatischen Linsen sphärische Aberrationen auftreten, kann dies nicht gewährleistet werden. Bei Kombination des Retroprismas mit einem 120° Dachkantprisma⁴⁶ ist der ausfallende Strahl sogar invariant zu Verschiebung des Retroprismas relativ zum Teststrahl und damit der Strahlüberlapp in der Probe auch für größere Verzögerungszeiten gesichert. Ein weiterer Vorteil dieses Aufbaus besteht darin, daß die Verzögerungsstrecke sich durch den doppelten Prismendurchgang auf 1.2 m, d. h. die maximale Verzögerungszeit auf 4 ns vergrößert.

Der Überlapp von Pump- und Testpuls in der Probe

Der Pump- und der Testpuls müssen sich in der Küvette räumlich optimal überlappen, um ein maximales Signal bei gegebener Pumpintensität zu erhalten. Der optimale Überlapp wird bei der Überlagerung und kolinearem Verlauf des Pump- und des Testpulsstrahls erreicht. Da nur der Testpuls detektiert werden soll, muß der Pumpuls vor dem Detektor ausgeblendet werden. Um den Pumpuls spektral zu unterdrücken, ist ein Monochromator zwischen Probe und Detektor eingebaut, der auf die Wellenlänge des Testpulses eingestellt ist. Die Wellenlängenunterschiede zwischen Pump- und Testpuls können sehr klein werden, so daß eine rein spektrale Trennung schwierig ist.

⁴⁶ Siehe Abbildung III-7.

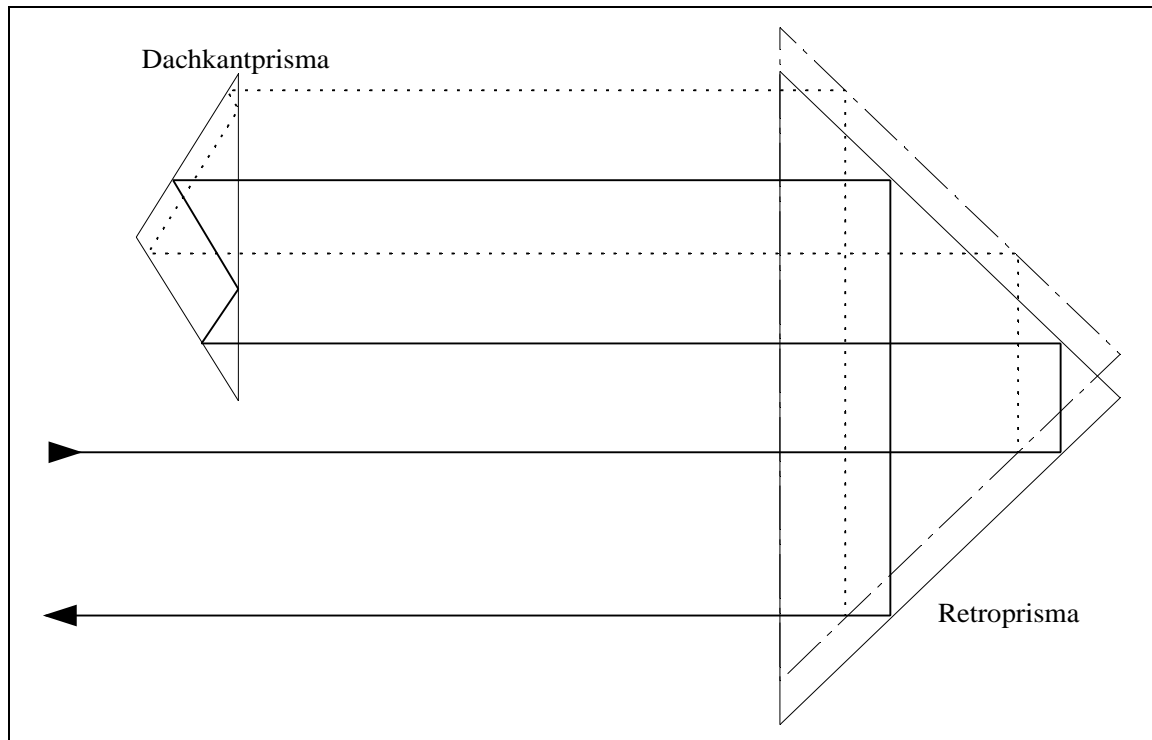


Abbildung III-7 Korrektur des Strahlversatzes durch die Kombination von Retro- und Dachkantprisma

Der Pump- und Testpulsstrahl werden deshalb in einem kleinen Winkel zueinander in der Probe zum Überlapp gebracht, um einerseits das Überlappungsvolumen so groß wie möglich zu halten und andererseits hinter der Probe den Pumpuls durch eine Blende ausblenden zu können.⁴⁷ Dafür werden die beiden Lichtstrahlen nach der Verzögerungsstrecke parallel in einem Abstand von 3 mm auf eine achromatische Linse ($f=12$ cm) gelenkt und von ihr auf die Probe fokussiert. Der Durchmesser wurde experimentell mit Hilfe eines Pinholes mit dem Durchmesser von $100\ \mu\text{m}$ und der Annahme eines gaußförmigen Strahlprofils durch Intensitätsmessungen für beide Laser auf $d_{1/2} = 90\ \mu\text{m}$ FWHM und $d = 160\ \mu\text{m}$ für 90 % der Intensität abgeschätzt. Der Winkel β zwischen den beiden Strahlen⁴⁸ beträgt 1.4° . Der räumliche Überlapp soll abgeschätzt werden. Die Beziehung

$$h = d / \sin(\beta) \quad \text{(III-6)}$$

ergibt die mittlere gemeinsame Wegstrecke h von etwa 6.4 mm. Der gesamte räumliche Überlapp kann näherungsweise durch vier identische Zylinderabschnitte mit der Höhe $H=h$, dem Radius $R=d/2$ und der Höhe $L=d/2$ des die Basis bildenden Kreissegments dargestellt werden.⁴⁹ Mit

⁴⁷ Siehe Abbildung III-6.

⁴⁸ Vgl. Abbildung III-8.

⁴⁹ Gekennzeichnet mit den Punkten ABC in Abbildung III-8.

$$a = \arccos\left(1 - \frac{L}{R}\right) \tag{III-7}$$

gilt für ein solches Volumenelement:

$$V = \frac{HR^3}{L} \left(\sin a - \frac{\sin^3 a}{3} - a \cos a \right) \tag{III-8}$$

[Bronstein, 1960]

Um den Überlapp in der Probe⁵⁰ zu berechnen, muß der Zylinderabschnitt parallel zur Grundebene in der Höhe $b/2$ geschnitten, also der Zylinderabschnitt ADE in Abbildung III-8 mit $H=h-b/2$, $R=d/2$ und $L=d/2$ abgezogen werden. Vier solcher geschnittenen Zylinderabschnitte bilden dann das Überlappvolumen in der Probe. Verglichen mit dem Volumen des Zylinders mit Durchmesser d und Höhe b (Küvetten Dicke) ergeben sich für $b = 2 \text{ mm}$ 95 % und für $b = 1 \text{ mm}$ 90 % Überlapp.

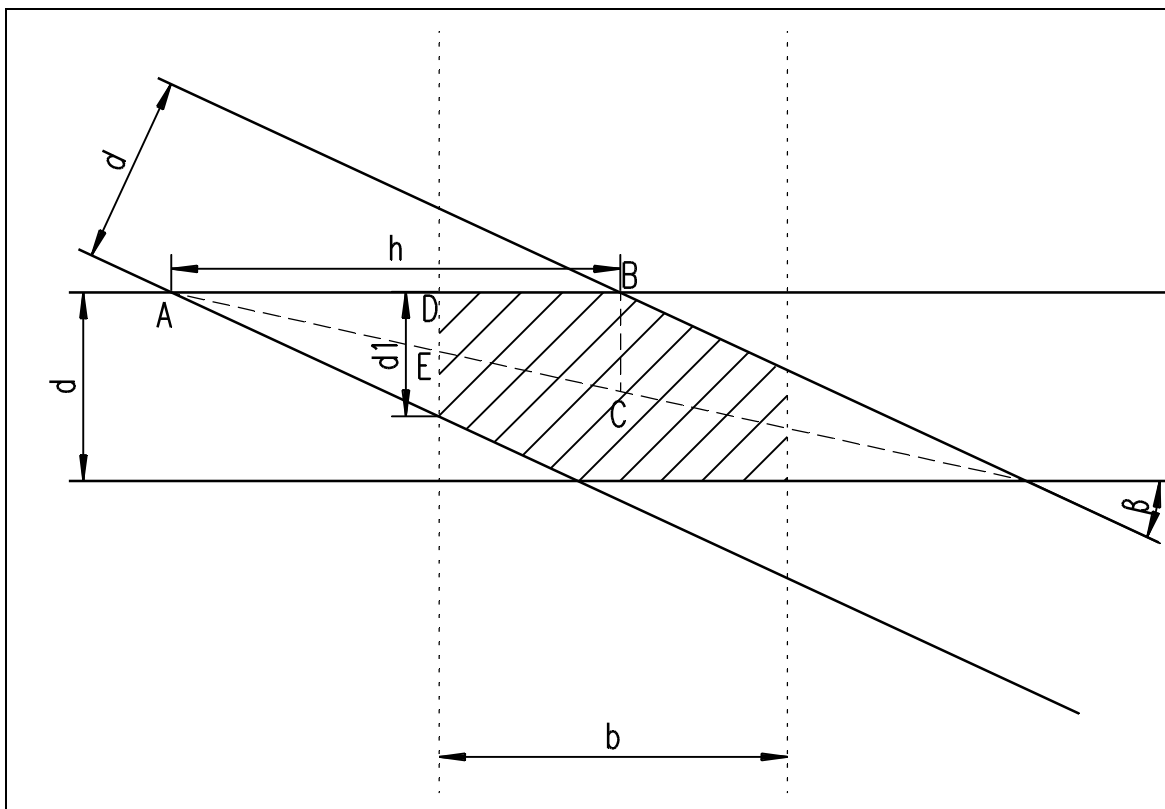


Abbildung III-8 Überlapp des Pump- und des Testpulsstrahls in der Probenküvette, Pump- und Testpulsstrahl mit Durchmesser d im Winkel β ; Probenküvette (----) mit Dicke b .

Der Überlapp ist proportional zum gemessenen ΔOD Signal. Allerdings muß bei einer Küvetten Dicke von 1 mm die Konzentration doppelt so hoch gewählt werden, um auf die

⁵⁰ Schraffiert in Abbildung III-8.

gleiche optische Dichte zu kommen. Arbeiten mit höheren Konzentrationen kann zu Problemen wie Probenaggregation führen. Außerdem ist die Justage des Überlapp empfindlicher gegen Störungen, so daß die 5 % geringere Signalgröße für $d = 2$ mm unproblematischer ist.

Die Rotationsküvette

Für die transienten Absorptionsmessungen ist es notwendig, daß die Probe, die vom Pumpuls angeregt wird, sich im Ausgangszustand befindet. Die hier zu untersuchenden Primärprozesse der Photosynthese⁵¹ finden auf einer Zeitskala von Pikosekunden bis Nanosekunden statt, weitere, sekundäre Ladungstransferschritte und Ladungsrekombinationen in den Ausgangszustand dauern aber ≥ 100 μ s. Eine entsprechende Reduzierung der Pulswiederholrate ist auf Grund des Signal/Rausch Verhältnisses nicht sinnvoll.⁵² Deshalb muß erstens ein rascher Probenaustausch zwischen zwei Pulsen und zweitens eine genügend lange Wiedereintrittszeit der Probe in den Strahl gewährleistet sein. Schatz *et al.* (1987) berichten von einer maximalen Anregungsintensität I von $2 \mu\text{J}/(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$ bei $670 \text{ nm} \cong 7\cdot 10^{12}$ Photonen/ $(\text{Puls}\cdot\text{cm}^2)$, um Annihilation an PS II Kernkomplexen zu verhindern. Folgende Berechnung soll die minimale Probenaustauschgeschwindigkeit abschätzen:

Die Pulswiederholfrequenz ν beträgt 400 kHz , der Strahldurchmesser $160 \mu\text{m}$. Bei einer Teilchengröße von $55 \text{ Chlorophyll pro } Q_A$ und einem Extinktionskoeffizienten ϵ von $65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 670 nm pro Chlorophyll ergibt dies einen Absorptionsquerschnitt σ von $1.4\cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$ pro PS II Kernkomplex. Die mittlere Anregungswahrscheinlichkeit pro Sekunde P beträgt

$$P = \sigma \cdot \phi = \sigma \cdot I \cdot \nu = 3.7 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \quad (\text{III-9})$$

d. h. alle $27 \mu\text{s}$ wird im Durchschnitt ein PS II Kernkomplex angeregt. Daraus folgt eine Mindestaustauschgeschwindigkeit von 6 m/s .⁵³

Die einfachste Lösung wäre ein Pumpsystem mit einer Durchflußküvette. Da aber bei einer optischen Dichte von 1 ($\cong 70 \mu\text{M Chl}$ für eine Küvettendicke von 2 mm) gearbeitet werden soll und Pumpsysteme, mit denen diese Austauschgeschwindigkeit erreicht werden kann, ein großes Totvolumen von ca. 100 ml aufweisen, würde dies zu einem Probenbedarf von ca. 7 mg Chl pro Probenansatz führen. Ein Präparationszyklus für PS II Kernkomplex aus Spinat ergibt aber nur ca. 1 mg Chl bei einem Arbeitsaufwand von ca. $2\text{-}3$ Manntagen. Damit ist

⁵¹ Energie- und primäre Ladungstransferschritte.

⁵² Siehe oben.

⁵³ Dies entspricht 7 l/min für eine $10 \times 2 \text{ mm}$ Durchflußküvette.

diese Methode nicht vertretbar. Deshalb wurde eine Rotationsküvette mit einem Durchmesser von 9.4 cm und einer Rotationsgeschwindigkeit von maximal 50 Hz konzipiert und angefertigt, mit der eine maximale Probenaustauschgeschwindigkeit von 15 m/s erreicht wird. Daraus folgt ein Wiedereintritt der Probe in den Pumpstrahl nach 20 ms. Für einige Systeme ist diese Zeit zu kurz, um wieder in den Grundzustand zu relaxieren, so daß zusätzlich eine lineare Hubbewegung mit einer Hubhöhe von 1 cm und einer Hubfrequenz von 3 Hz möglich ist. Dies ist die minimale Hubfrequenz, um auch an den Scheitelpunkten der Hubbewegung 160 μm Hub innerhalb von 20 ms zu erreichen. Damit wird die Wiedereintrittszeit auf 160 ms vergrößert. Das minimal benötigte Probenvolumen für den Einsatz der Rotationsküvette mit Hubbewegung beträgt 5.5 ml ($\cong 375 \mu\text{g}$ Chl für PS II Kernkomplex), und für den Einsatz der Rotationsküvette ohne Hub wurde ein minimales Probenvolumen von 700 μl ($\cong 50 \mu\text{g}$ Chl) experimentell bestimmt.

Bei einer Rotationsfrequenz von 50 Hz und einem Radius von 4.7 cm beträgt die Radialbeschleunigung $4600 \text{ m/s}^2 = 470 \cdot g$. Zum Vergleich: $6700 \cdot g$ werden benutzt, um die PS II Kernkomplexe in Zentrifugen zu konzentrieren, also die 15fache Radialbeschleunigung. Trotzdem ist eine Veränderung der Konzentration der Probe während einer Messung nicht auszuschließen, die damit die gemessenen Kinetiken verfälschen kann. Messungen zeigen aber nur einen Abfall des gemessenen ΔOD Signals von maximal 5% innerhalb einer Stunde. Ein Meßzyklus dauert ca. 15 min, so daß der Einfluß der Konzentrationsänderung durch die Radialbeschleunigung vernachlässigt werden kann.

Die Unterdrückung der Fluoreszenz

Der Monochromator und die Blende hinter der Probe haben neben der Reduzierung des Streulichtanteils, hervorgerufen durch den Pumpimpuls, noch eine weitere Funktion, die der Unterdrückung der Fluoreszenz, die von Pump- und Testimpuls ausgelöst wird. Eine Abschätzung soll zeigen, wie groß der Einfluß der Fluoreszenz des Pumpimpulses auf das Meßsignal ist:

Die Fluoreszenz wird isotrop in alle Richtungen abgestrahlt. Durch die Einengung des Raumwinkels mit Hilfe der Blende zwischen Probe und Monochromator⁵⁴ wird ein Unterdrückungsverhältnis von $1:10^5$ erreicht. Bei Annahme einer Fluoreszenzquantenausbeute der Probe $\Phi_{\text{fl}} = 10 \%$ und einer optischen Dichte der Probe von 1 OD bei der Pumpwellenlänge beträgt somit die Intensität der Fluoreszenz durch die Blende 10^{-6} der Pumpintensität. Bei typischerweise 1 nm Bandbreite des Monochromators und einer Bandbreite der Fluoreszenz von mindestens

⁵⁴ Durchmesser 1 mm, Abstand von der Probe 100 mm.

10 nm für die meisten Chromophore wird bei Detektion im Maximum der Fluoreszenz eine weitere Signalunterdrückung um mindestens den Faktor 10 erreicht. Die Intensität des Testpulses I_T beträgt typischerweise 1 % des Pumpulses. Ein Rauschniveau von $\Delta I_T / I_T$ von 10^{-4} ist angestrebt. Die Intensität der Fluoreszenz am Detektor I_{fl} beträgt maximal $I_{fl} / I_T = 10^{-5}$ und ist damit eine Größenordnung unter der des angestrebten Rauschniveaus und sollte damit keinen Beitrag am Meßsignal haben.

Da die Intensität des Testpulses nur ca. 1% des Pumpulses beträgt, kann der Beitrag der durch den Testpuls hervorgerufenen Fluoreszenz erst recht vernachlässigt werden.

III.2.2 Modulation und Detektion

Für die Messung eines ΔOD Signals ist es notwendig, die Intensität der Transmission des Testpulses ohne und mit Pumpuls zu messen.⁵⁵ Außerdem ist eine Meßmethode gefordert, die ein sehr gutes Signal/Rausch Verhältnis bietet. Die günstigste Variante dafür ist die Modulation der Pump- und Testpulse mit zwei unabhängigen Trägerfrequenzen und die Detektion mit Hilfe der frequenzselektiven doppelten Lock-in Technik [Sorem (1972)].

Für die Absorptionsänderung $\Delta OD(t)$ soll hier das Wirkungsprinzip der Modulation und der Detektion bei sinusförmiger Modulation der Pump- und Testpulse berechnet werden.

$$I(t) = I_0 \frac{1 + \sin 2\mathbf{p}_1 t'}{2} * \exp(-OD - \Delta OD(t) \frac{1 + \sin 2\mathbf{p}_2 t'}{2}) \quad (\text{III-10})$$

nach Taylorentwicklung erster Ordnung ergibt sich:

$$\begin{aligned} I(t) &= I_0 10^{-OD} \left(\frac{1}{2} - \frac{\ln 10}{4} \Delta OD(t) \right) \\ &+ I_0 10^{-OD} \left(\frac{1}{2} - \frac{\ln 10}{4} \Delta OD(t) \right) \sin 2\mathbf{p}_1 t' \quad = A \\ &- \frac{\ln 10}{4} I_0 10^{-OD} \Delta OD(t) \sin 2\mathbf{p}_2 t' \quad = B \quad (\text{III-11}) \\ &- \frac{\ln 10}{8} I_0 10^{-OD} \Delta OD(t) \cos 2\mathbf{p}(\mathbf{n}_1 - \mathbf{n}_2) t' \\ &+ \frac{\ln 10}{8} I_0 10^{-OD} \Delta OD(t) \cos 2\mathbf{p}(\mathbf{n}_1 + \mathbf{n}_2) t' \quad = C \end{aligned}$$

mit I_0 – Intensität des Testpulses vor der Probe; t – zeitlicher Abstand zwischen Pump- und Testpuls; $I(t)$ – Intensität des transmittierten Testpulses am Detektor; OD – optische Dichte des Grundzustandes der Probe; $\Delta OD(t)$ – induzierte Änderung der optischen Dichte mit dem Pumpuls; ν_1, ν_2 – Modulationsfrequenzen der Test- und Pumpulse.

⁵⁵ Siehe Gleichung (II-9).

Das Signal, das die Information über $\Delta OD(t)$ enthält, spaltet sich also auf in einen statischen Anteil, und in Anteile bei der Testpulsmodulationsfrequenz ν_1 , der Pumpulsmodulationsfrequenz ν_2 und deren Summen- und Differenzfrequenzen. Bei der Frequenz ν_1 kann ΔOD nicht gemessen werden, da es von dem vielfach größeren Testpulstransmissionssignal überlagert wird. Es bleiben also die Pumpfrequenz und die Summen- und Differenzfrequenz zur Detektion. Daraus ergibt sich für die Messung von $\Delta OD(t)$

$$\Delta OD(t) = -2 \log e \frac{B}{A - 2B} \quad \text{für Detektion bei } \nu_1 \quad \text{(III-12)}$$

$$\Delta OD(t) = -4 \log e \frac{B}{A - 2B} \quad \text{für Detektion bei } \nu_1 - \nu_2 \text{ und } \nu_1 + \nu_2 \quad \text{(III-13)}$$

Man sieht also, daß bei der Detektion auf der Pumpfrequenz ein doppelt so großes Signal gemessen werden kann wie auf der Summen- oder Differenzfrequenz.

Wahl des Modulationsverfahrens für die Messung von transienten Absorptionssignalen

Der Photomultiplier detektiert das transmittierte Licht des Testpulses, aber auch zu einem gewissen Teil die Fluoreszenz der Probe, Streu- und Raumlicht. Deshalb müssen die einzelnen Anteile anhand ihrer Frequenzabhängigkeit analysiert werden, um die optimale Detektionsmethode zu wählen.

Die Aufteilung der verschiedenen Frequenzen am Detektionssignal des Photomultiplier ist in Abbildung III-9 gezeigt. Aus den Gleichungen (III-12) und (III-13) folgt, daß das detektierte ΔOD -Signal bei ν_2 doppelt so groß wie auf der Summen- bzw. der Differenzfrequenz ist. Allerdings ist auf dieser Detektionsfrequenz ein konstanter Offset des Meßsignals durch Streulicht (b) und Fluoreszenz (d), ausgelöst durch den Pumpuls, zu erwarten, der auf der Summenfrequenz nicht vorhanden ist⁵⁶. Die Größe des durch die Fluoreszenz hervorgerufenen konstanten Hintergrundsignals bei ν_2 ist im vorigen Abschnitt abgeschätzt und eine Größenordnung kleiner als das Rauschen berechnet. Streulicht des Pumpstrahls wird nur bei Detektion in der Nähe der Testwellenlänge eine Rolle spielen, da zwischen Probe und Detektor ein Monochromator aufgebaut ist. Kontrollversuche zeigen, daß Streulicht bei einem spektralen Abstand von Pump- und Testwellenlänge von > 3 nm nicht detektierbar ist. Beide Anteile sind aber unabhängig von der zeitlichen Verzögerung t zwischen Pump- und Testpuls. Somit können diese Anteile durch Ausblenden des Testpulses gemessen und von dem gemessenen Signal auf der Pumpfrequenz abgezogen werden.

⁵⁶ Siehe Abb. III-9

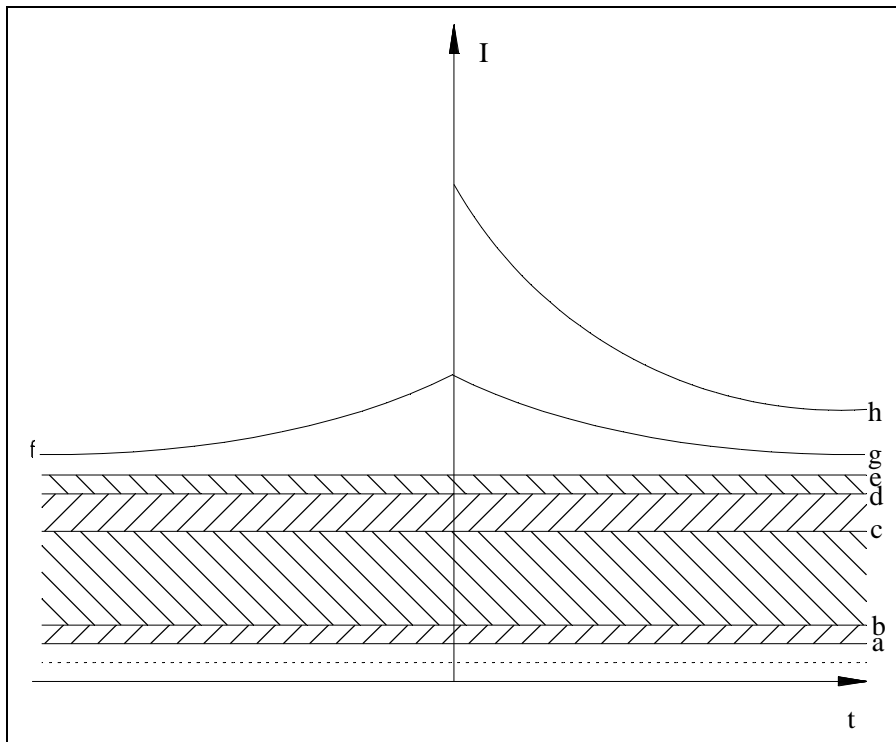


Abbildung III-9 Das detektierte Lichtsignal als Funktion der Zeitverzögerung t zwischen Anregungs- und Testpuls aufgeteilt nach Ursprung und Frequenzabhängigkeit nicht maßstabsgerecht (nach Brock, 1987)

Ursprung der Signale:

- a) Dunkelrauschen und Raumlicht
- b) Streulicht des Pumpstrahls
- c) Transmittierter Teststrahl
- d) Fluoreszenz, induziert durch den Pumpstrahl
- e) Fluoreszenz, induziert durch den Teststrahl
- f) Fluoreszenz, induziert durch den Teststrahl, moduliert durch den Pumpstrahl
- g) Fluoreszenz, induziert durch den Pumpstrahl, moduliert durch den Teststrahl
- h) Transmittierter Teststrahl, moduliert durch den Anregungsstrahl

Frequenzabhängigkeit:

- /// - ν_2 des Pumppulses
- \\ - ν_1 des Testpulses
- $\nu_1 \pm \nu_2$ und ν_2
- ... - frequenzunabhängig

Vergleiche beider Detektionsmethoden im Experiment zeigen, daß die Detektion auf der Pumpfrequenz durch die konstanten Beiträge zwar aufwendiger sind, durch das doppelt so große Signal aber das Signal/Rausch Verhältnis effektiv verdoppelt wird und deshalb diese Methode für Messungen der transienten Absorptionssignale zur Anwendung kommt.⁵⁷

⁵⁷ Siehe Abbildung III-10.

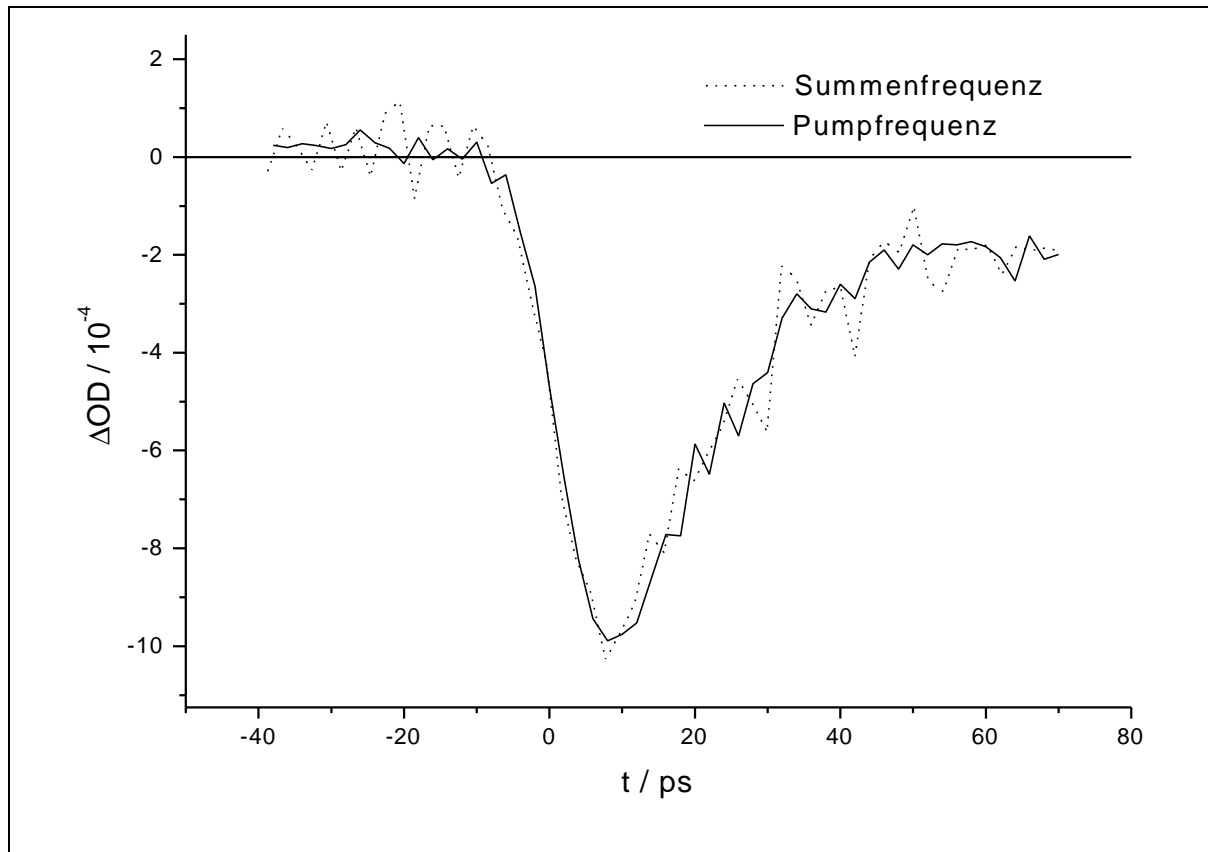


Abbildung III-10 Vergleich des Rauschens für die Detektion bei der Summenfrequenz von Pump- und Testpulsmodulation und für die Detektion bei der Pumpfrequenz nach Normierung der Signalgröße.
Messung an Pinacyanol in Ethanol, angeregt bei 620 nm, detektiert bei 625 nm.

Detektionsmodus bei der Kreuzkorrelationsmessung

Bei der Messung der Kreuzkorrelation wiederum ist die Detektion auf der Summenfrequenz vorteilhaft, da einerseits das Signal mehrere Größenordnungen größer als das Rauschen ist. Andererseits muß bei Kreuzkorrelationsmessungen nicht nur der zeitliche und räumliche Überlapp im KDP gegeben sein, sondern auch die Phasenanpassung durch den Winkel des Kristalls zu den Strahlen. Da wegen des kleinen Winkels zwischen den beiden Strahlen, die auf den Kristall fallen und teilweise ähnlicher Wellenlängen, liegen die Phasenanpassungswinkel der Kreuzkorrelation und der Generierung der zweiten Harmonischen der beiden Strahlen dicht beieinander. Die Effizienz der Generierung der zweiten Harmonischen ist auch bedeutend größer, so daß die Identifizierung des Kreuzkorrelationssignals auf der Pumpfrequenz deutlich erschwert wird. Zusätzlich ist das Signal der Kreuzkorrelation nur linear, das der zweiten Harmonischen quadratisch von der Intensität des Pumpulses abhängig, so daß Intensitätsfluktuationen des Pumplasers ein stärkeres Rauschen des Hintergrundsignals zur Folge haben. Die Einflüsse der zweiten Harmonischen bei der Detektion der Kreuzkorrelation auf der Summenfrequenz werden vollständig unterdrückt, da sie keinen Beitrag bei dieser Frequenz haben.

Modulationsform von Pump- und Testpuls

Die hier verwendeten Lock-in Verstärker (EG&G 7260) sind auf die Detektion sinusförmiger Signale optimiert – d. h. die interne Referenzfrequenz für die Lock-in Detektion ist ein Sinus. Aus diesem Grund und zur Unterdrückung höherer Harmonischer wurde für die Modulation der Testpulse ein sinusförmiges Signal benutzt. Dafür konnte der eingebaute Frequenzgenerator des Lock-in Verstärkers genutzt werden, dessen Signal an den Treiber des akusto-optischen Modulators weitergegeben wird. Die Verwendung von Sinussignalen für die Modulation der Pumppulse hat aber einen entscheidenden Nachteil gegenüber einer Rechteckmodulation: Sie ist nur anwendbar, wenn sichergestellt ist, daß die Kinetik der Probe in dem verwendeten Intensitätsbereich unabhängig von der Pumpintensität ist. Im Abschnitt II.1.3 wird die Problematik der Annihilation diskutiert, die in großen gekoppelten Chromophorsystemen schon bei niedrigen Anregungsintensitäten auftreten. Für intensitätsabhängige Studien, die z. B. Einflüsse von Annihilationseffekten untersuchen, ist eine definierte Anregungsintensität notwendig, die bei einer Rechteckmodulation, aber nicht bei einer Sinusmodulation gegeben ist.

Ein weiterer Vorteil der Rechteckmodulation für gleiche Modulationstiefen A ist ein um $\pi/2$ größerer Anteil der Grundharmonischen, siehe

$$\frac{A}{2} \left(1 + \frac{P}{2} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{(-1)^i}{(2i+1)!} \sin((2i+1)2\mathbf{p}_2 t) \right) \quad (\text{III-14})$$

für die Fourierreihe eines Rechteckpulses mit Modulationstiefe A , die ein um dem Faktor $\pi/2$ größeres Signal am Lock-in Widerstand ergibt. Deshalb wird für die Modulation des Pumppulses eine Rechteckfunktion verwendet, die über einen Frequenzgenerator (Philips PM 5715) erzeugt wird.

Elektronische Ansteuerung und computergestützte Experimentsteuerung

Abbildung III-11 zeigt ein Blockschaltbild der Experimentsteuerung für transiente Absorptionssignale und der dazugehörigen Kreuzkorrelation. Das Grundgerüst ist fast identisch: Frequenzgeneratoren geben die Modulationsfrequenz und -form an die akusto-optischen Modulatoren, die die Pump- und Testpulse modulieren. Über einen PMT⁵⁸ findet die Detektion des Testpulses hinter der Probe⁵⁹ bzw. hinter dem KDP-Kristall für die Messung der Kreuzkorrelation statt. Für ΔOD -Messungen wird das Signal in zwei Lock-in Verstärkern auf der Testpulsfrequenz für die Intensitätsmessung und auf der Pumpfrequenz für die ΔI -Messung

⁵⁸ Vgl. Abbildung III-6.

⁵⁹ Für die Messung von ΔOD .

geleitet, die über den Computer digital ausgelesen werden. Im Gegensatz dazu ist für die Messung der Kreuzkorrelation nur das Signal auf der Summenfrequenz notwendig. Dazu werden die Modulationsfrequenzen in einen phasenrichtigen Frequenzaddierer gegeben und das Ausgangssignal als Referenzfrequenz an einen Lock-in Verstärker geleitet. Das Meßsignal wird wiederum vom PC ausgelesen.

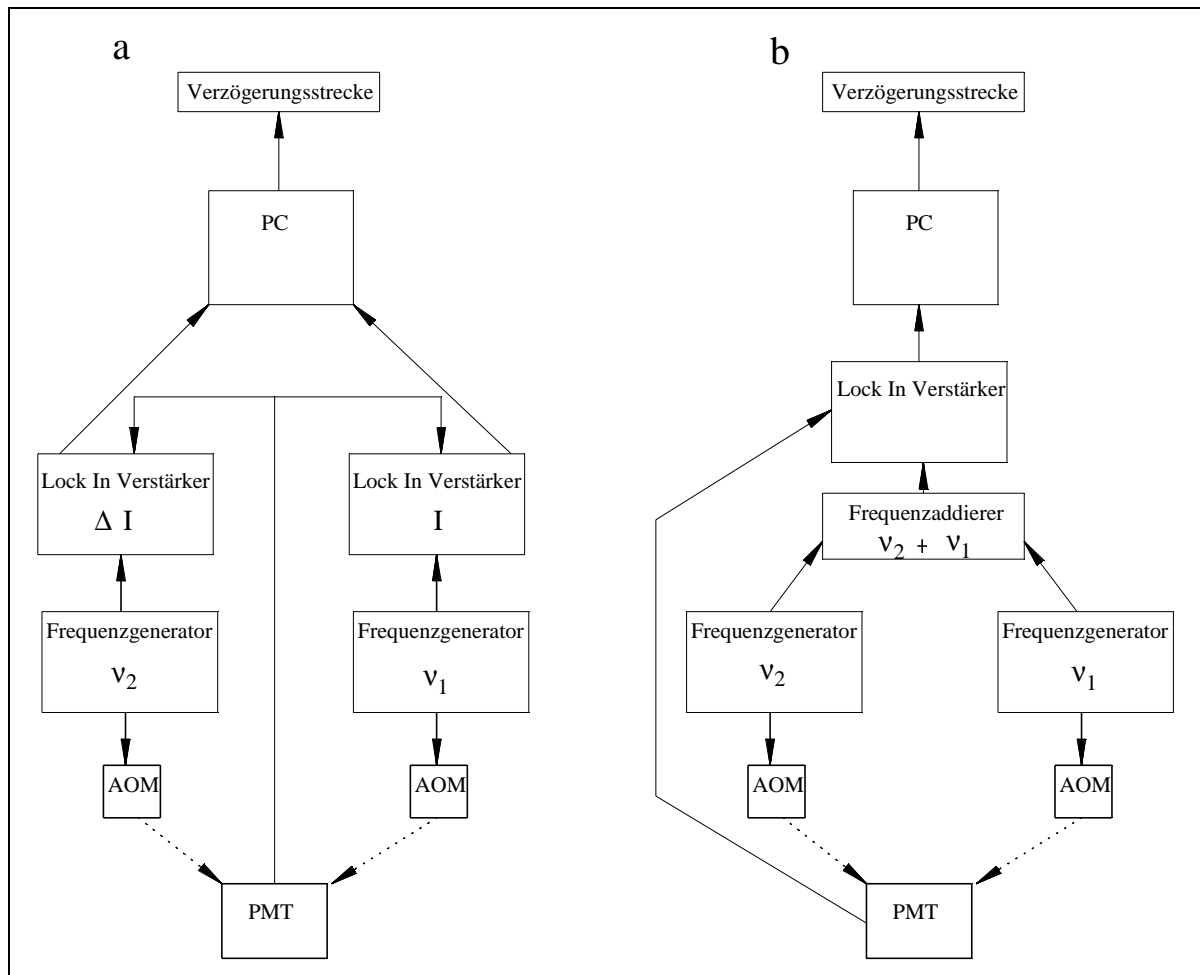


Abbildung III-11 Blockschaltbild der Experimentsteuerung

a) Messung von ΔOD ; b) Messung der Kreuzkorrelation.

Zur Experimentsteuerung wurde ein Programm in C++ entwickelt, das in den Grundzügen auf ein Programm von R. Dziwior (1998) zurückgeht. Es steuert die Verzögerungsstrecke an und stellt frei vorgegebene Verzögerungszeiten zwischen Pump- und Testpuls ein. An diesen Punkten wird I und ΔI aus den Lock-in Verstärkern für die ΔOD Messung ausgelesen, daraus ΔOD berechnet⁶⁰ und die Punkte werden graphisch dargestellt. Die Anzahl der Messungen bei einer Verzögerungszeit sowie die Anzahl der Meßzyklen sind frei wählbar. Für Messungen

⁶⁰ Für die Kreuzkorrelation wird nur I ausgelesen.

von ΔOD kann der durch die Fluoreszenz und das Streulicht erzeugte Hintergrund⁶¹ gemessen und dann automatisch abgezogen werden. Weiterhin sind Funktionen zur getrennten Ansteuerung des Monochromators und der Verzögerungsstrecke und zur Wellenlängendetektion des Pump- und des Testpulses integriert. Verschiedene Exportformate für Speicherung der gemessenen Daten, wie ein Origin-kompatibles Datenformat und zwei ASCII-Formate sind möglich.

Die Wahl der Modulationsfrequenzen

Die Modulation der Pump- und Testpulse geschieht über akusto- optische Modulatoren (Isle Optics LM080 mit Treiber MD080A), die über Frequenzgeneratoren (Philips PM 5715) angesteuert werden. Die obere Grenzfrequenz der Modulation wird durch die Pulswiederholrate der Laser gegeben, die von 80 kHz bis 4 MHz reicht. Die AOMs und die Frequenzgeneratoren stellen hier mit Maximalfrequenzen von 2 MHz bzw. 50 MHz keine Beschränkung dar. Auch die eingesetzten Lock-in Verstärker (EG&G 7260) mit Detektionsfrequenzen bis zu 250 kHz liegen über der minimalen Pulswiederholrate. Der beschränkende Faktor hier ist die Frequenzcharakteristik des Photomultipliers. Ein Photomultiplier liefert im linearen Arbeitsbereich der Lichtintensität proportionale Ströme, die erst in Spannungssignale umgewandelt werden müssen. Dies geschieht hier über das Abgreifen der Spannung über einen parallel geschalteten Widerstand. Die Auswahl der maximalen Größe des Widerstandes wird in Hamamatsu (1995) beschrieben. Die minimale Größe des Widerstandes wird durch das Eigenrauschen des Lock-in Verstärkers bestimmt, so daß die gemessenen Signale und das Laserrauschen größer als das Eigenrauschen sind. Der eingesetzte Widerstand von 10 k Ω wurde experimentell durch Rausch- und Linearitätstests ermittelt. Die maximale Spannung für die Linearität des Photomultipliers bei diesem Abschlußwiderstand beträgt 25 mV.

Die parallele Schaltung eines Widerstandes zu Kondensatoren stellt einen Tiefpaß dar, so daß in der Kombination des Photomultipliers mit dem parallelen Widerstand und der Eingangskapazität des Lock-in Verstärkers ein Tiefpaß entsteht. Die Detektionsempfindlichkeit des Photomultipliers in Abhängigkeit von der Frequenz ist in Abbildung III-12 dargestellt. Dabei zeigt sich, daß der für die Modulation zur Verfügung stehende Frequenzbereich bis zu 32 kHz⁶² liegt.

⁶¹ Siehe oben.

⁶² Signal > 90 % der Maximalamplitude.

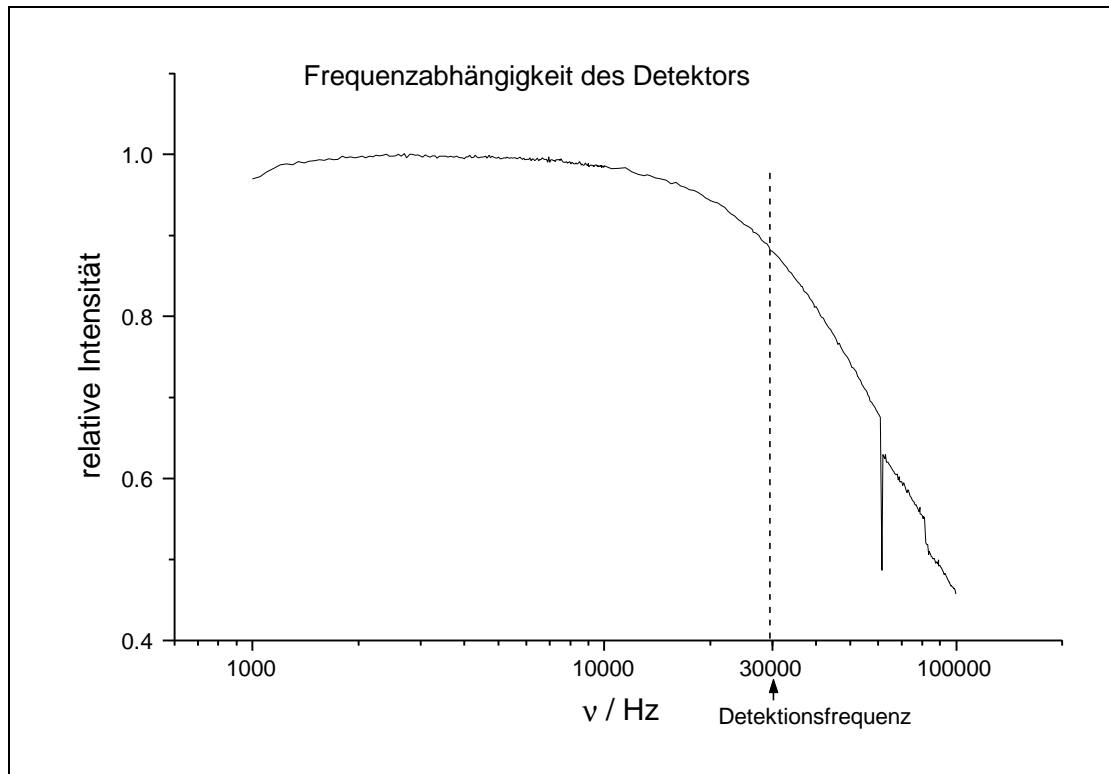


Abbildung III-12 relative Amplitude des Photomultipliersignals mit einem $10\text{ k}\Omega$ Abschlußwiderstand von der Detektionsfrequenz
Der Laser wurde mit der gleichen Frequenz über einen AOM moduliert.

Weiterhin hängt die Wahl der Modulationsfrequenzen vom intrinsischen Rauschen des gesamten Systems (Laser, Photomultiplier, Rotationsküvette) ab. Die Wahl der Modulationsfrequenz des Testlasers ist relativ unkritisch, da die Signale ca. 20 mV betragen, also mindestens drei Größenordnungen über dem des Rauschen liegen. Die Modulationsfrequenz wurde daher willkürlich auf 3.3 kHz festgelegt. Abbildung III-13 zeigt das frequenzabhängige Rauschen der transienten Absorptionsanlage. Dabei wurde die Modulationsfrequenz des Testlasers auf 3.3 kHz festgehalten, die Detektionsfrequenz verändert und die Signalamplitude des Rauschens unter verschiedenen Meßbedingungen aufgezeichnet. Die erste Messung⁶³ zeigt den Rauscheinfluß des Testlasers und des Detektors. Hohe Rauschanteile sind in den ersten 2 kHz zu sehen, die vornehmlich auf das Dunkelrauschen des Detektors⁶⁴ zurückzuführen sind. Ab ca. 15 kHz sinkt der Rauschanteil des Detektors stark und ist kleiner als das Laser-rauschen.

Die Vielfachen der Modulationsfrequenz sind deutlich als Signal detektierbar, obwohl die angelegte Modulationsspannung eine Sinusform hat. Eine Erklärung dafür wäre die nicht ideale Umsetzung des Modulationssignals in die Intensitätsmodulation der Laserpulse durch

⁶³ Gestrichelte Linie.

⁶⁴ Messungen hier nicht gezeigt.

den akusto-optischen Modulator. Demnach sind Vielfache der Modulationsfrequenz des Testlasers ungeeignet für die Detektion der ΔOD Signale.

Ein weiterer Beitrag zum Rauschen stammt von der eingesetzten Rotationsküvette, die mit einer Frequenz von 50 Hz rotiert. Der kleinere Beitrag stammt von Übertragungen der Vibrationen auf die Laser, die damit instabiler laufen. Eine Verbesserung wäre durch einen Aufbau der Küvette auf einem mechanisch vom Lasertisch isolierten Tisch erreichbar, konnte aber aus Platzgründen zur Zeit nicht realisiert werden.

Der weitaus größere Rauschanteil folgt aus der Vibration der Rotationsküvette selbst. So zeigten Experimente, daß bei mechanischer Entkopplung von Küvettenhalterung und Lasertisch durch vibrationsdämmende Materialien ein starkes Anwachsen des Rauschens, die auf starke Vibrationen der Küvette inklusive Halterung zurückzuführen ist. Demnach wurde eine starre Verbindung zwischen Experimentiertisch und Küvettenhalterung hergestellt. Der Einfluß der Küvette auf das Rauschen ist in Abbildung III-13⁶⁵ gezeigt. Für die Messung wurde Oxazin in Ethanol gelöst benutzt.

Die Rauschmessungen zeigen, daß nur ein kleines Fenster mit minimalem Rauschen zwischen 25 kHz und 32 kHz nutzbar ist. Über 32 kHz wirkt der Detektor durch den Abschlußwiderstand als Tiefpaß.⁶⁶ Gewählt wurde eine Detektionsfrequenz von 30 kHz.

Das Partikelrauschen der Probe

Neben den systeminhärenten Störquellen beeinflussen auch Streueffekte und statistische Fluktuationen der Partikelzahl in dem vom Laser belichteten Volumen das Signal/Rausch Verhältnis. Der Einfluß dieser Effekte kann erheblich sein. Das Frequenzspektrum des Partikelrauschens sollte unabhängig von der Probe ein $1/\nu$ -Verhalten⁶⁷ aufweisen, da die Änderung der Partikelzahl zwischen zwei Lichtblitzen wie eine sprunghafte Änderung der Probenkonzentration wirkt.

Abbildung III-13⁶⁸ zeigt den Einfluß des Schrotrauschens auf das Rauschspektrum. Das Rauschniveau liegt bei der Detektionsfrequenz von 30 kHz um den Faktor 1.5 höher als bei der sonst identischen Messung an Oxazin in Ethanol.

⁶⁵ Gepunktete Linie.

⁶⁶ Siehe oben.

⁶⁷ Mit ν -Pulswiederhol frequenz.

⁶⁸ Durchgezogene Linie.

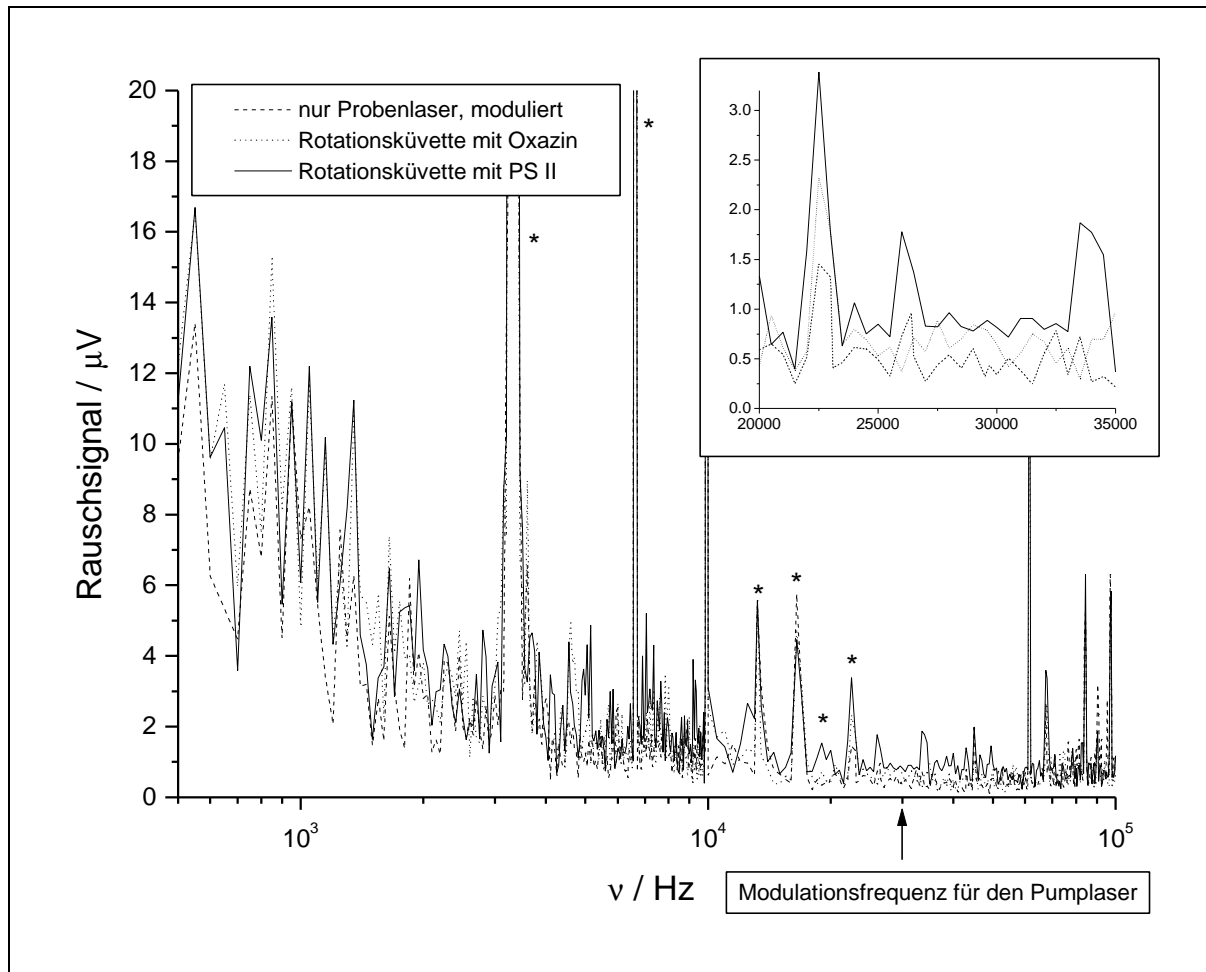


Abbildung III-13 Rauschspektrum der transienten Absorptionsanlage unter verschiedenen Bedingungen

a) (----) Rauscheinflüsse des Detektors und des Lasersystems;

b) (....) Einfluß der Rotationsküvette (mit Oxazin);

c) (—) Rauschen mit PS II Partikeln;

alle Messungen wurden bei $\lambda_{\text{pump}} = 670 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{test}} = 680 \text{ nm}$ durchgeführt.

* – $N \times$ Lasermodulationsfrequenz;

das Inset zeigt eine Ausschnittsvergrößerung in der Nähe der gewählten Modulationsfrequenz.

III.2.3 Testmessungen zur Charakterisierung der Transienten Absorptionsanlage

Zur Charakterisierung der Transienten Absorptionsanlage wurden Testmessungen an den gut untersuchten Farbstoffen Oxazin I und Pinacyanol in Ethanol durchgeführt. Dabei konnte das Rauschniveau der Apparatur⁶⁹ bei negativen Zeiten, d. h. der Testpuls kommt vor dem Pumpuls und der zeitliche Überlapp der Pulse ist Null, gemessen werden. Bei Einsatz der Rotationsküvette wurde σ für einen Meßzyklus mit typischerweise $2\text{-}3 \cdot 10^{-5}$ OD bestimmt, ohne Rotation der Küvette ist das Rauschen kleiner als $1 \cdot 10^{-5}$ OD.

Für Pinacyanol in Ethanol werden Relaxationszeiten von 11–13 ps berichtet [Sundstrom und Gilbro (1981) und (1983)]. Die Messung der Fluoreszenzzerfalls mittels TCSPC⁷⁰, die von mir durchgeführt wurde, ergab eine Lebensdauer von 12 ps. Die Auswertung der Absorp-

⁶⁹ Berechnet als Standardabweichung σ des Signals.

⁷⁰ Anregung 630 nm, Detektion 640 nm.

tionsdifferenzmessung an Pinacyanol⁷¹ nach Entfaltung ergibt einen zweifachexponentiellen Zerfall mit $\tau_1 = 12.5$ ps (90.5 %) und $\tau_2 > 200$ ps (90.5 %). Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der schnellen Zerfallskomponente mit den bekannten Daten. Es besteht also in diesem Zeitbereich noch kein Problem mit der Zeitauflösung. Auf Grund des kleinen Zeitfensters ist die Zerfallszeit der zweiten Komponente nicht aufgelöst, sie wird durch die Bildung eines langlebigen Isomers verursacht [Sundstrom und Gilbro (1981), Rentsch *et al.* (1981)].

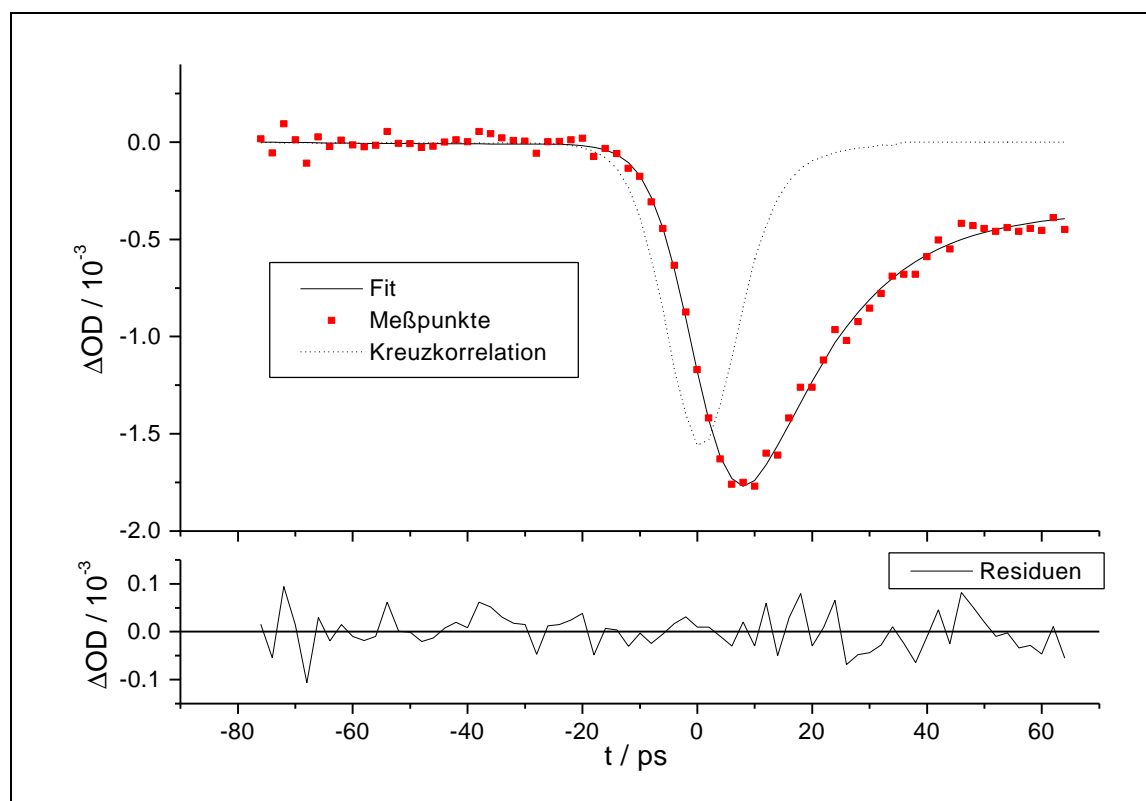


Abbildung III-14 Absorptionsdifferenzmessung von Pinacyanol in Ethanol, Anregung: 630 nm, $3 \mu\text{J}/(\text{puls} \cdot \text{cm}^2)$; Detektion: 640 nm, Optische Schichtdicke 2 mm, $T=295$ K, Rotationsküvette: $\nu=50$ Hz, ein Meßzyklus, Rauschen: $2.5 \cdot 10^{-5}$ OD

Um die Linearität der Anlage im langen Zeitbereich zu testen und Artefakte, die bei der Veränderung des räumlichen Überlapps in der Probe auftreten, sichtbar zu machen, wurde Oxazin 1 in Ethanol vermessen. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen mittels TCSPC ergaben einen zweifach exponentiellen Zerfall mit 930 ps und 18 ps. Referenzwerte, gemessen mittels Fluoreszenz- und Absorptionsdifferenzspektroskopie [Brock (1987), Müller (1991)] sind einfach exponentielle Zerfälle von ca. 900 ps. Aus der Datenanalyse der Messung⁷² erhält man 932 ps (88 %) und 22 ps (12 %). Diese Zeiten stimmen sehr gut mit den aus der Fluoreszenz ermittelten Werten überein. Weiterhin ist die lange Zerfallszeit identisch mit den in der Literatur angegebenen Werten.

⁷¹ Abbildung III-14.

⁷² Abbildung III-15.

Insgesamt kann daraus geschlossen werden, daß sowohl Zeiten im Bereich von 10 ps als auch lange, im ns Bereich liegende Zerfallszeiten zuverlässig mit der transienten Absorptionsanlage gemessen werden können.

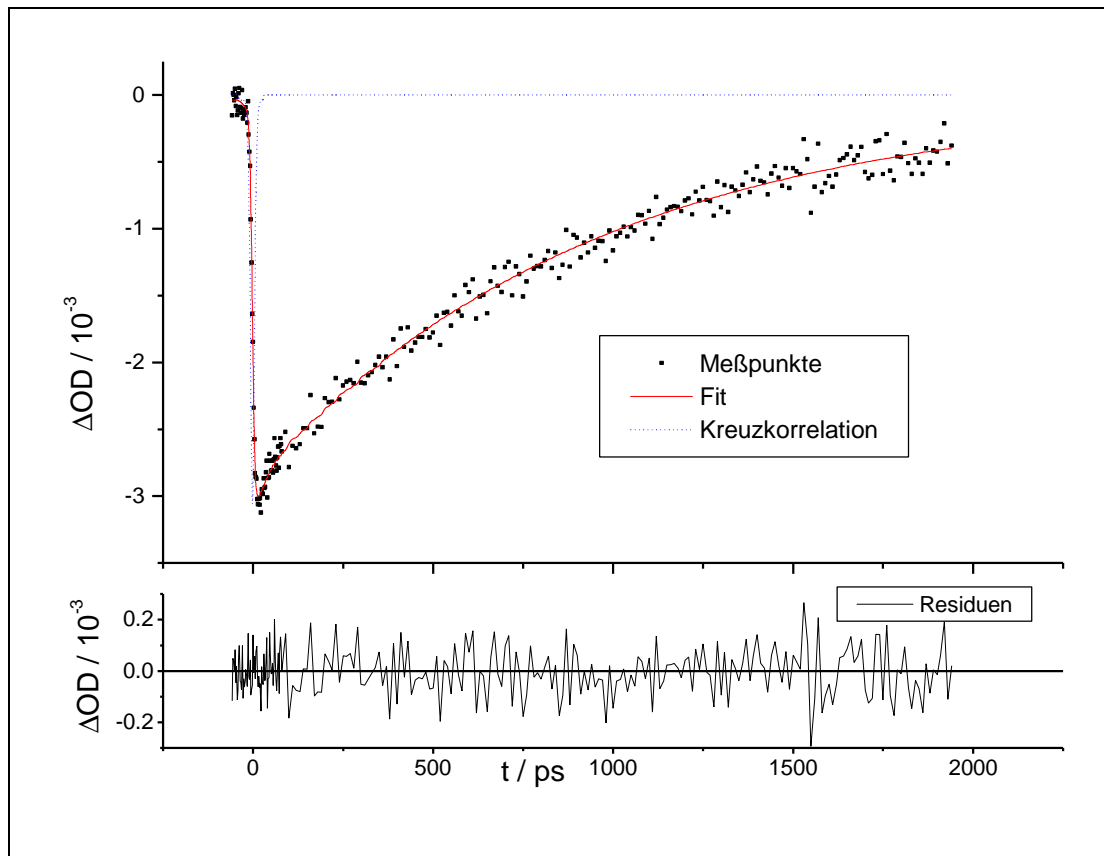


Abbildung III-15 Absorptionsdifferenzspektrum von Oxazin in Ethanol
 $\tau_1 = 934$ ps; $\tau_2 = 22$ ps; $\lambda_{\text{pump}} = 645$ nm; $\lambda_{\text{test}} = 637$ nm.

III.3 Die Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Zur Messung von Fluoreszenzkinetiken im ps Zeitbereich werden kurze Anregungspulse und schnelle Detektionssysteme benötigt. Die Erzeugung der Anregungspulse geschieht über das in Abschnitt III.1 beschriebene Lasersystem mit Pulsbreiten von ca. 8 ps. Die Detektion der Fluoreszenzkinetiken erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich mit Hilfe der Technik der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (*time correlated single photon counting*, TCSPC). Diese Technik ist anderen zeitaufgelösten Fluoreszenzmeßverfahren wie der Streackamera [Tsuchiya (1984), Campillo und Shapiro (1984)], Fluoreszenz-Up-Conversion [Mahr und Hirsch (1975)] oder die Phasen-Fluorometrie [Lacowicz et.al. (1985)] durch ein sehr gutes Signal/Rausch Verhältnis über die Poissonstatistik und einem großen dynamischen Bereich von 4 bis 5 Größenordnungen in diesem Zeitbereich überlegen. Weiterhin erlaubt die hohe Empfindlichkeit der Methode, mit sehr geringen Anregungsintensitäten zu arbeiten.

Eine ausführliche Behandlung der Technik der zeitaufgelösten Einzelphotonenzählung findet sich in [O'Connor und Phillips (1984)], trotzdem sollen hier kurz die Grundlagen und der technische Aufbau der verwendeten Apparatur dargestellt werden.

Das TCSPT beruht auf einer Schlußfolgerung der Ergodenhypothese, die besagt, daß die für ein einzelnes Atom oder Molekül geltende zeitliche Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Emission eines Photons den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz eines Ensembles dieser Atome oder Moleküle widerspiegelt. Durch die Detektion von maximal einem Ereignis, d. h. Photon pro Experiment und dessen zeitlicher Korrelation kann bei hinreichend großer Anzahl der Experimente (10^6 - 10^7 Ereignisse) und Einordnen der zeitlichen Korrelation, in ein Histogramm der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzzerfalls sehr genau beschrieben werden.

III.3.1 Meßprinzip und elektronische Detektion

Der Fluoreszenzanregungspuls wird über einen Strahlteiler aufgespalten und ein kleiner Teil als Referenzpuls von einer Photodiode (Antel AR-S2)⁷³ detektiert, der die Spannungsrampe eines Zeit zu Amplituden Konverters (Ortec 457, TAC) startet. Der Hauptteil des Anregungspulses führt in der Probe zum Auslösen eines Fluoreszenzphotons, das über einen Photomultiplier (Microchannelplate, Hamamatsu R3809U-01 mit *extended* Multialkalikathode, zur Verringerung des Dunkelrauschens mit Peltierkühlung auf -30°C temperiert, typisch 10 Pulse/s) detektiert, die Spannungsrampe des TAC stoppt. Diese Spannung ist proportional zur Zeitdifferenz zwischen Start- und Stoppuls, d. h. zwischen Anregung und Emission. Sie wird von einem Analog-zu-Digital Konverter (Tracor Northern TC1212A, ADC) ausgelesen und an einen PC mit Multikanalanalysator (Target, MCA) weitergegeben, der die Ereignisse in einem Histogramm mit konstanter zeitlicher Kanalbreite zählt.

In der Praxis wird der Referenzpuls elektronisch verzögert und dient als Stoppuls, um elektronische Totzeiten, die nach dem Start der Spannungsrampe durch die elektronischen Prozesse in TAC und ADC entstehen, zu minimieren. Um Pulshöhenunterschiede der Signale des Photomultipliers zu kompensieren, wird das Signal amplitudenbegrenzt und durch einen Verstärker (Hamamatsu C5594) zeitlich verbreitert in einen Diskriminator (*constant fraction discriminator*, CFD, Ortec 9307) geleitet, der unabhängig von der Signalamplitude einen festen Startwert an den TAC gibt. Das gleiche Verfahren gilt für den Stoppuls mit Einsatz von Dämpfer, Verstärker und Diskriminator (Camberra CM2128). Die Kalibrierung der Kanalbreite findet über die Wiederholfrequenz des Argonlasers statt (ca. 82 MHz, die genaue Frequenz wird über den Modelockertreiber bestimmt), da der Cavity Dumper des Farbstofflasers

⁷³ Die in Klammern angegebenen Geräte sind in diesem Experimentaufbau zum Einsatz gekommen

den nachfolgenden Puls nach dem ausgekoppelten Puls nicht vollständig unterdrückt und damit bei der Messung der zeitlichen Apparateantwortfunktion⁷⁴ detektiert wird. Alle hier vorgestellten Messungen wurden mit einer Kanalbreite von ca. 5.2 ps durchgeführt. Bei 4096 Kanälen ergibt dies ein meßbares Zeitfenster von 21 ns.

III.3.2 Optischer Aufbau

Eine Prinzipskizze der TCSPC-Apparatur ist in Abbildung III-16 gezeigt. Die Anregung findet über das beschriebene Lasersystem mit Wiederholraten von 0.4 bis 4 MHz statt. Der Anregungspuls wird je nach Anwendung auf 1 mm bzw. 2 mm Durchmesser auf die Probe fokussiert, die sich in einer Durchfluß-Fluoreszenzküvette (2x2 mm² Grundfläche, Starna) befindet. Die Abschwächung des Anregungspulses erfolgt über reflektive Neutralsichtfilter, um Weglängenunterschiede bei unterschiedlichen Anregungsintensitäten zu verhindern. Die Detektion der Fluoreszenz verläuft senkrecht zur Anregung über eine, den Raumwinkel begrenzende Blende und einen Folienpolarisator im sogenannten magischen Winkel von 54.7°, um Anisotropieeffekte zu unterdrücken. Mit einer achromatischen Linse wird die Fluoreszenz auf einen Doppelmonochromator in subtraktiver Anordnung (Jobin Yvon DH10-VIS) als wellenlängenselektives Element (je nach Spaltbreite 4 bzw. 8 nm Halbwertsbreite) fokussiert und danach auf den Photomultiplier gelenkt. Der Doppelmonochromator hat neben dem hohen Unterdrückungsverhältnis von Licht anderer Wellenlängen (z. B. Streulicht der Anregung) auch die Funktion, Weglängenunterschiede, die durch den Durchlauf eines einfachen Monochromators entstehen, zu kompensieren und damit die zeitliche Systemantwortfunktion nicht zu verbreitern.

Die zeitliche Systemantwortfunktion wird mit einer Streulösung⁷⁵ bei der Anregungswellenlänge aufgenommen. Die typische Halbwertsbreite beträgt 40 ps, sie wird im wesentlichen durch die Pulsbreite des Anregungspulses, des *timing jitters* des TAC und des *transit time spread* des Detektors, bestimmt. Als *timing jitter* bezeichnet man die Unschärfe in der Bestimmung der Start- und Stopzeitpunkte im TAC. *Transit time spread* wird durch unterschiedliche Laufzeiten der Sekundärelektronen im Photomultiplier hervorgerufen, der bei der verwendeten 6 µm Microchannelplate mit 25 ps spezifiziert ist. Ein weiterer wichtiger Einfluß auf die Breite der Systemantwortfunktion sind Weglängenunterschiede der emittierten Photonen vom der Küvette zum Detektor. Eine Minimierung dieser Unterschiede wird durch die Begrenzung des Raumwinkels, der achromatischen Linse und einen Doppelmonochromator in subtraktiver Anordnung erreicht.

⁷⁴ Siehe unten.

⁷⁵ 20% Lösung von Siliziumdioxidpartikeln (DuPont, Ludox AS40) in Wasser/Ethanol 1:1.

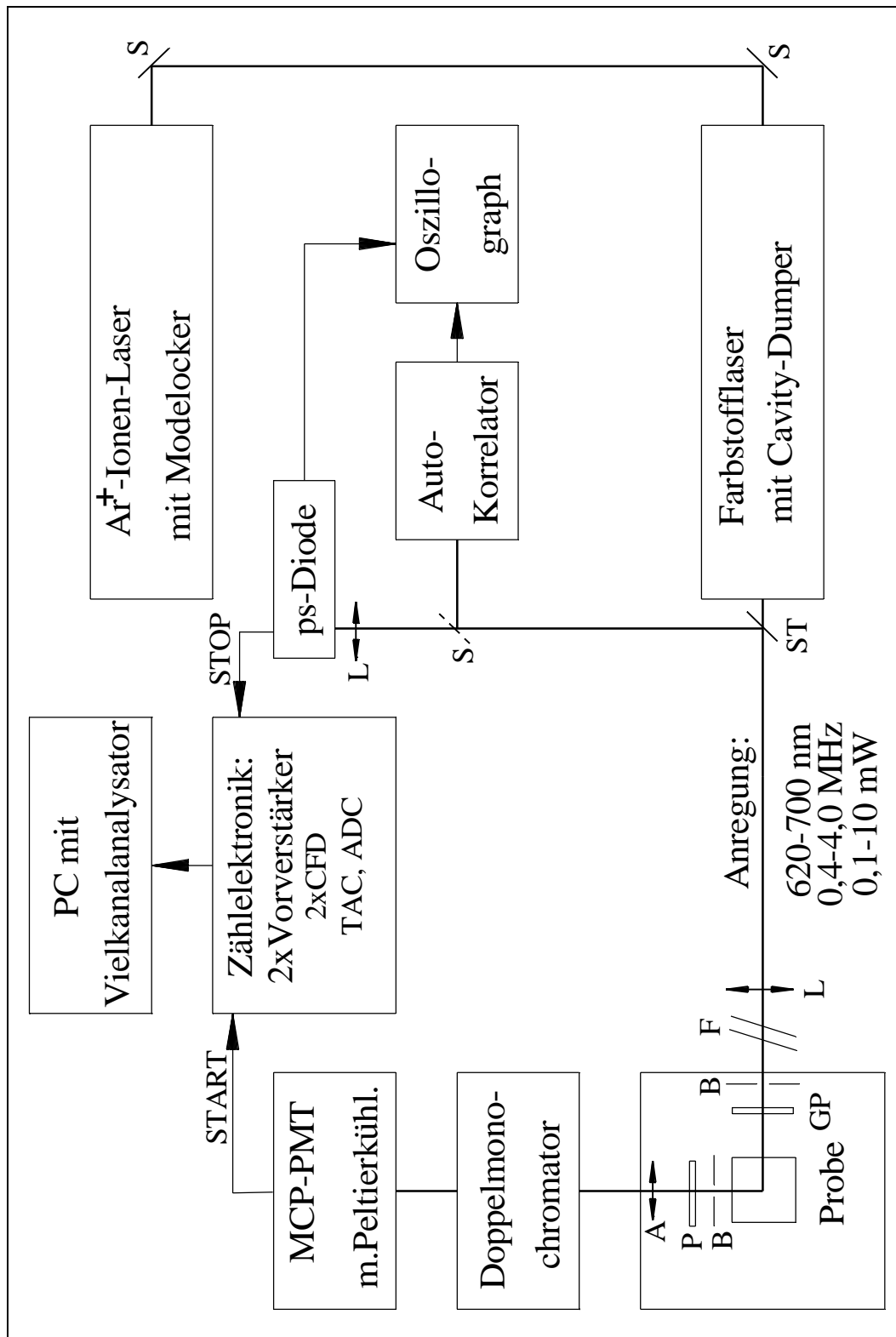


Abbildung III-16 Schematische Darstellung der Meßapparatur der zeitaufgelösten Einzelphotonenzählung zur Messung von ps Fluoreszenzkinetiken

A – achromatische Linse; L – Linse; B – Blende; GP – Glan Thompson Polarisator;
 P – Folienpolarisator (54,7°); S – Spiegel; ST – Strahlteiler,
 F – Neutraldichtefilter (Erklärungen siehe Text).

Die Systemantwortfunktion wird bei jedem zu messenden Fluoreszenzzerfall vor- und nachher aufgenommen und für die Datenauswertung⁷⁶ über Vorwärtsentfaltung mit der gemessenen Fluoreszenzzerfallskurve benötigt, um auch Zerfallszeiten ermitteln zu können, die kürzer als die Systemantwortfunktion sind.⁷⁷

III.3.3 Anregungsintensität und Poissonstatistik

Das oben skizzierte Meßprinzip beruht darauf, daß maximal ein Fluoreszenzphoton pro Anregungspuls gemessen werden soll. Bei der Detektion mehrerer Photonen am Photomultiplier kann nur das erste Photon die Spannungsrampe des TAC starten und somit vermessen werden. Später ankommende Photonen werden nicht berücksichtigt und führen somit zu einer Unterbestimmung langlebiger Zerfallskomponenten. Da das Detektieren der einzelnen Photonen seltenen Ereignissen entspricht, gehorchen sie einer Poissonstatistik. Somit kann das Auftreten von mehreren Photonen abgeschätzt werden mit:

$$p_k = \frac{\mu^k}{k!} \cdot e^{-\mu} \quad (\text{III-15})$$

Dabei ist p_k die normierte Wahrscheinlichkeit für die Zählung von k Ereignissen und μ der Erwartungswert der Verteilung. Bei einer Detektionsrate von 0.1% der Anregungsfrequenz ist die Wahrscheinlichkeit der Detektion von zwei Photonen dreitausend mal kleiner als die Detektion eines Photons. Für eine Detektionsrate von 1 % ergibt sich noch ein Verhältnis von 1:300. Die Standardabweichung S für die Anzahl der detektierten Ereignisse μ in einem Kanal ist für die Poissonstatistik $S=\mu^{1/2}$ und beträgt bei typischerweise 30000 Ereignissen im Maximumkanal 170. Bei einer Detektionswahrscheinlichkeit von 0.1% beträgt die Störung durch das Auftreten von zwei Photonen im Maximumkanal 10 Ereignisse und bei 1% 100 Ereignisse. Der Fehler bei 0.1% ist also um mehr als eine Größenordnung geringer als das Rauschen und demnach vernachlässigbar. Selbst bei 1% ist er noch geringer als das Rauschen und stellt eine obere Grenze der Detektionsrate dar. Die Messungen wurden mit einer Anregungsfrequenz von 800 kHz und einer maximalen Detektionsrate⁷⁸ von 0.7 % durchgeführt. Damit ist gleichzeitig die maximale Anregungsintensität bestimmt.

III.4 Datenanalyse

Der Signalverlauf der Fluoreszenz- und Absorptionsdifferenzmessungen ist durch die Faltung der Systemantwortfunktion der Apparatur $P(t)$ und der intrinsischen Kinetik $F(t)$ gegeben.

⁷⁶ Siehe unten.

⁷⁷ Siehe unten.

⁷⁸ Abhängig von der Emissionswellenlänge.

$$M(t) = \int_0^t P(t') \cdot F(t-t') dt' \quad \text{(III-16)}$$

Dabei ist die Systemantwortfunktion der Fluoreszenzkinetikmessungen die Funktion, die mit der Streulösung bei der Anregungswellenlänge gemessen wird⁷⁹ und deren zeitlicher Verlauf sowohl durch die Detektionselektronik als auch durch die Breite des Anregungspulses gegeben ist. Demgegenüber ist die Systemantwortfunktion für die Absorptionsdifferenzmessungen die Kreuzkorrelation zwischen Pump- und Testpuls und ist demnach nur von der Breite der Laserpulse und deren zeitlichen Schwankungen zueinander abhängig⁸⁰. Das Interesse besteht nun, die Funktion $F(t)$ zu extrahieren und die gemessenen Kurven $M(t)$ mit theoretisch erzeugten Kurven anzupassen.⁸¹ Zur Bestimmung der reinen Zerfallskinetiken werden iterative Vorwärtsentfaltungsalgorithmen angewandt.⁸² Die Parameter der Modellfunktion werden dann iterativ an die Meßkurven angepaßt. Fast alle Algorithmen zur Datenanpassung arbeiten nach der Methode der Minimierung der reduzierten Fehlerquadrate. Eine bewährter und schneller Algorithmus zur Datenanpassung, der in dieser Arbeit ausschließlich angewandt wird, ist der Levenberg-Marquardt-Algorithmus [Levenberg (1944), Marquardt (1963)]. Um die Methode der reduzierten Fehlerquadrate anwenden zu können, ist die Berücksichtigung der Rauschverteilung der einzelnen Experimente notwendig. Wie im Abschnitt III.3.3 diskutiert, tritt bei der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) eine Poissonverteilung auf, deren Standardabweichung proportional zur Quadratwurzel des Signals S_i ist. Die resultierende reduzierte Fehlerquadratsumme χ^2 ergibt sich zu:

$$c^2 = \frac{1}{n-p-1} \sum_{i=1}^n \frac{[S_i - S_{i,fit}]^2}{S_i} \quad \text{(III-17)}$$

n – Anzahl der Meßdaten; p – Anzahl der freien Fitparameter; $S_{i,fit}$ – theoretisches Signal

Im Gegensatz dazu sind die gemessenen Absorptionsdifferenzdaten mit einem konstanten, der Signalthöhe unabhängigen Rauschen behaftet. Die Standardabweichung σ , die das Rauschen beschreibt, läßt sich aus der Streuung der Datenpunkte S_i im negativen Zeitbereich der gemessenen Absorptionsdifferenzkinetiken – d. h. der Testpuls kommt zeitlich vor dem Pumpimpuls und die Pulse überlappen noch nicht – ermitteln:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (S_i - \bar{S})^2} \quad \text{(III-18)}$$

Das reduzierte χ^2 für Absorptionsdifferenzdaten ergibt sich damit zu:

⁷⁹ Siehe oben.

⁸⁰ Siehe Abschnitt III.1.3.

⁸¹ Zur Datenanalyse vgl. Holzwarth (1996).

$$c^2 = \frac{1}{s^2 \cdot (n - p - 1)} \sum_{i=1}^n [S_i - S_{i,fit}]^2 \quad (\text{III-19})$$

Für optimale Datenanpassung ergibt sich $\chi^2 = 1$. Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Qualität der Datenanpassung sind die Residuen für die Absorptionsdifferenzdaten und die gewichteten Residuen für TCSPC, an denen systematische Abweichungen zwischen Meßdaten und Fit erkennbar sind. Sie berechnen sich aus

$$\begin{aligned} R_i &= S_i - S_{i,fit} && \text{Absorption} \\ R_i &= \frac{S_i - S_{i,fit}}{\sqrt{S_i}} && \text{Fluoreszenz} \end{aligned} \quad (\text{III-20})$$

und werden zusammen mit den Fitdaten dargestellt.

III.4.1 Einzelzerfallslebensdaueranalyse

Als Grundlage aller hier vorgenommenen Analysen wird vorausgesetzt, daß sich sämtliche Kinetiken als Differentialgleichungssysteme erster Ordnung beschreiben lassen. Dieser Ansatz stellt für die meisten photosynthetischen Prozesse eine gute Beschreibung dar. Als Ergebnis erhält man eine Summe von Exponentialfunktionen der Form:

$$F(t, I_{ex}, I_{det}) = \sum_{i=1}^n A_i(I_{ex}, I_{det}) \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{III-21})$$

mit n Exponentialfunktionen der Amplitude A_i , die von der Anregungs- und der Detektionswellenlänge abhängen, und den Zerfallszeiten τ_i , wobei τ_i auch eine Funktion der Wellenlängen sein könnte. Diese Funktion wird nach Gleichung III-16 einer Zerfallskurve $S(t)$ angepaßt, wobei neben den $2i$ Parametern für die Amplituden und Zeiten noch zwei weitere Parameter eingefügt werden, die den konstanten Meßsignaluntergrund und die zeitliche Verschiebung zwischen Meßkurve und Systemantwortfunktion (*shift*) anpassen. Die Ursache dieses *shift*-Parameters liegt bei der Fluoreszenz in leicht unterschiedlichen Weglängen bei den unterschiedlichen Wellenlängen für Fluoreszenz und IRF und Langzeitinstabilitäten des Lasersystems begründet. In der Absorption ist er auf unterschiedliche Detektionsaufbauten für die Kreuzkorrelation und die Absorptionsdifferenzmessungen⁸³ und Langzeitinstabilitäten zwischen Pump- und Testpuls laser zurückzuführen.

⁸² Vgl. z. B. O'Connor und Phillips (1984).

⁸³ Vgl. Abbildung III-6.

III.4.2 Globale Lebensdaueranalyse

Bei Gültigkeit eines Differentialgleichungsansatzes erster Ordnung läßt sich aus der Gleichung III-21 ablesen, daß zwar die Amplituden, aber nicht die Zerfallszeiten von der Anregungs- und Detektionswellenlänge abhängen. Somit kann bei gleichzeitiger Anpassung von N Datensätzen mit n Zerfallskomponenten, die z. B. bei einer Wellenlänge angeregt, aber bei verschiedenen Wellenlängen detektiert wurden, die Anzahl der freien Parameter von $2 \cdot N \cdot n$ auf $N(n+1)$ reduziert werden. Diese Herangehensweise nennt man globale Lebensdaueranalyse [Knutson *et al.* (1983)]. Bei allen numerischen Modellen für die Datenanpassung über eine Globalanalyse wird versucht, einzelne Parameter zu extrahieren, die für alle Meßkurven identisch sind, um somit die Anzahl der freien Parameter zu senken [Beechem *et al.* (1985a) und (1985b)]. Dadurch wird im Allgemeinen die numerische Konvergenz des Algorithmus verbessert und die Zerfallszeiten und Amplituden werden mit größerer Genauigkeit bestimmt. Dicht beieinander liegende Lebensdauern können so mit der Globalanalyse wesentlich besser aufgelöst werden als mit einer Einzelzerfallsanalyse.

Für zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren ist $\sum A_i(\lambda)\tau_i$ proportional zur Quantenausbeute der Fluoreszenz an einer bestimmten Detektionswellenlänge λ , also proportional zur Intensität des stationären Fluoreszenzspektrums bei λ . $A_i(\lambda)\tau_i / \sum A_i(\lambda)\tau_i$ gibt den relativen Beitrag der Komponente mit der Zerfallszeit τ_i an der Fluoreszenzausbeute bei λ an. Normiert man $\sum A_i(\lambda)\tau_i$ auf das stationäre Fluoreszenzspektrum, so stellen die Amplituden einer Zerfallszeit τ_i für verschiedene Wellenlängen den spektralen Verlauf dieser Zerfallskomponente dar. Diese Darstellung nennt man *Decay-associated spectra* (DAS).

Bei den Absorptiondifferenzspektren ist keine Normierung der berechneten Amplituden notwendig, soweit sich für unterschiedliche Messungen die Anregungsintensität oder die Probenkonzentration nicht ändern.⁸⁴

III.4.3 Globale Targetanalyse

Die Analyse der Meßergebnisse über ihre Zerfallszeiten und deren Amplituden stellt eine mathematische Beschreibung des Systems dar. Diese mathematische Beschreibung selbst enthält aber noch keine physikalischen Parameter, die erst über Modellannahmen aus der mathematischen Beschreibung gewonnen werden können. Eine andere Herangehensweise an die Datenanalyse von Meßkurven, die Targetanalyse, ist das direkte Anpassen von physikalischen Modellen, wie z. B. ein Energietransfer- oder ein Reaktionsschema mit den entsprechenden Ratenkonstanten zwischen den beteiligten Zuständen und den charakteristischen Amplituden

⁸⁴ Siehe unten.

dieser Zustände [Ameloot et.al. (1986), Beechem et.al. (1985a)]. Diese Amplituden sind in der Fluoreszenz die charakteristischen stationären Fluoreszenzspektren der entsprechenden Spezies (*species-associated emission spectrum*, SAES) und in den transienten Absorptionsmessungen die Absorptionsdifferenzspektren der Zustände (*species-associated difference spectrum*, SADS). Der wesentliche Vorteil dieser Methode der Datenanalyse besteht neben der direkten Extraktion der physikalisch relevanten Daten und einer realistischen Fehlerabschätzung⁸⁵ die Möglichkeit der Einschränkung von Fitparametern und damit Erhöhung der Genauigkeit, da Kenntnisse über die zu vermessende Probe, wie zum Beispiel Lebensdauern einzelner Spezies verwendet werden können. Weiterhin lassen sich mit der Methode viele verschiedene Modelle an den Daten testen und wegen möglicherweise physikalisch nicht sinnvoller Ergebnisse ausschließen.

Als Voraussetzung für die Auswertung eines solchen Modells ist wie für den Ansatz der Summe von Exponentialfunktionen die Annahme einer Kinetik erster Ordnung, das die zeitliche Besetzungszahlentwicklung mit einem linearen Differentialgleichungssystem erster Ordnung beschreibt.

$$\frac{d\mathbf{N}(t)}{dt} = T \cdot \mathbf{N}(t) + \underline{\mathbf{e}}_0(\mathbf{I}_{exc})P(t) \quad (\text{III-22})$$

$\mathbf{N}(t)$ -($n \times 1$)-Besetzungsdichtevektor der n Zustände; $\underline{\mathbf{e}}_0(\lambda_{exc})$ - ($n \times 1$)-Vektor der Absorptionskonstanten zum Zeitnullpunkt bei der Anregungswellenlänge λ_{exc} , $P(t)$ -zeitliches Intensitätsprofil der Anregung, T -($n \times n$)-Transfermatrix, die die Konnektivität der einzelnen Zustände beschreibt mit $T_{ij}=k_{ij}$ ($i \neq j$) und eine die Hauptdiagonale betreffende Involution [Ameloot et.al. (1986)].

Eine weitere Voraussetzung für die Anpassung eines Modells an einen gegebenen Datensatz ist, daß alle Zustände in mindestens einem Parameter, wie z. B. kinetisch oder spektral unterscheidbar sein müssen. Sind Zustände nicht unterscheidbar in einem gegebenen Datensatz von Meßpunkten, müssen sie in Gruppen zusammengefaßt werden. Ein Beispiel stellen hier die angeregten Antennenchlorophylle in der Photosystem II Kernkomplexantenne dar, die mit den verwendeten Meßmethoden nicht einzeln aufgelöst werden können.

Die Zeitabhängigkeit der intrinsischen Funktion $F(t, \lambda)$ berechnet sich wie folgt:

$$F(t, \mathbf{I}_i) = \sum_{j=1}^n \exp(\gamma_j t) \cdot \sum_{k=1}^n S_k(\mathbf{I}_i) [U^{-1} \underline{\mathbf{e}}_0(\mathbf{I}_{exc})]_j \cdot U_{jk} \quad (\text{III-23})$$

Dabei sind U_{jk} die Matrix aus Eigenvektoren und γ_j der j -te Eigenwert von T , der mit der beobachteten Lebensdauer aus Gleichung III-21 wie folgt in Verbindung steht:

⁸⁵ Siehe unten.

$$\mathbf{g}_j = \frac{1}{t_j} \quad (\text{III-24})$$

$S_k(\lambda_i)$ stellen hier die oben besprochenen SAES oder SADS der entsprechenden Zustände dar. Aus den beiden oberen Gleichungen und der Gleichung (III-21) wird weiterhin ersichtlich, daß die DAS eine Linearkombination der SADS bzw. SAES darstellen.

III.4.4 Fehleranalyse

Ein wichtiger Punkt bei der Auswertung der Meßergebnisse und deren Analyse stellt die Fehlerbetrachtung dar. Da der Vertrauensbereich teilweise sehr unsymmetrisch um den Erwartungswert liegt [Johnson (1983)], ist die aussagekräftigste und eleganteste Methode zur Bestimmung des Vertrauensbereiches eines Wertes die sogenannte *Exhaustive search analysis* [Beechem et.al. (1991)]. Diese untersucht die Form der χ^2 -Oberfläche in unmittelbarer Umgebung des Erwartungswertes. Hierbei wird ein bestimmter Fitparameter schrittweise von seinem Erwartungswert⁸⁶ entfernt und läßt die anderen Parameter diese Störung kompensieren.

Die Signifikanz der Verschlechterung der Fitqualität wird definiert über das Verhältnis F zweier reduzierter χ^2 -Werte, die einer Fischer-Verteilung unterliegen. [Pugh und Winslow (1966)]. Für die gegebene Anzahl von Freiheitsgraden⁸⁷ und der Festlegung eines Vertrauensbereichs von 67 %⁸⁸ kann der F-Faktor berechnet werden, mit dem das χ^2 maximal anwachsen darf. Mit diesem F-Faktor lassen sich wiederum die Fehlerbereiche über die *Exhaustive search analysis* für einzelne Parameter berechnen. Dieses Verfahren wird für jeden freien Parameter durchgeführt.

III.4.5 Praktische Durchführung der Datenanalyse

Für die Datenanalyse, wie die Einzel- und Globallebensdaueranalyse sowie die Targetanalyse sowohl der Fluoreszenz- als auch der Absorptionsdaten wurde das Global Unlimited Software Paket, entwickelt vom Laboratory of Fluorescence Dynamics at the University of Illinois at Urbana-Champaign, angewandt. Sämtliche Zerfallsdaten wurden erst einzeln und dann global analysiert, um das globale χ^2 -Minimum zu finden. Da das Programmpaket für die Auswertung von TCSPC-Daten optimiert wurde und gewisse Einschränkungen sowohl in der Anwendung verschiedener Datenformate als auch in der Fehlerstatistik hat, wurde die Auswertung der Absorptionsdaten wie folgt durchgeführt:

⁸⁶ Minimum der χ^2 -Oberfläche.

⁸⁷ Nummer der Datenpunkte minus der Anzahl der freien Fitparameter.

⁸⁸ Entspricht einer Standardabweichung.

Die Vorwärtsfaltungsroutine der Meßkurve mit der Systemantwortfunktion erfordert äquidistante Schritte und positive Eingangswerte. Alle Daten werden mit einer Poissonstatistik gewichtet. Um trotzdem transiente Absorptionsdaten korrekt auswerten zu können, wurde folgender Algorithmus angewandt:

- Die Meßpunkte sind für den Zeitbereich -100 ps bis 300 ps äquidistant mit einem Δt von 2 ps gewählt. In diesem Zeitbereich können Zerfallszeiten bis zu 100 ps, bei denen eine Entfaltung mit der Kreuzkorrelation notwendig ist, sicher ermittelt werden.
- Für alle Datensätze i wird im negativen Zeitbereich nach Gleichung (III-18) die Standardabweichung σ_i ermittelt und ein konstantes Offset O_i auf den Datensatz i mit den Signalamplituden S_{ij} addiert, der proportional zu σ_i^2 ist. Dabei muß weiterhin gewährleistet sein, daß das Offset groß gegen die maximale Signalamplitude ist. Somit folgt aus Gleichung (III-17) wegen $O_j \gg S_{ij}$, daß die Daten nicht mehr mit einer Poissonverteilung gewichtet werden, sondern alle Datenpunkte mit einem konstanten Wert O_i . Wegen der Proportionalität von O_i und dem Quadrat der Standardabweichung σ_i folgt aus Gleichung (III-19) eine korrekte Wichtung der Datensätze :

$$\begin{aligned}
 c_i^2 &= \frac{1}{n-p-1} \sum_{j=1}^n \frac{[(S_{ij} + O_i) - (S_{ij,fit} + O_i)]^2}{S_i + O_i} \\
 &\approx \frac{1}{O_i(n-p-1)} \sum_{j=1}^n [S_{ij} - S_{ij,fit}]^2 \quad \text{(III-25)} \\
 &\propto \frac{1}{s_i^2(n-p-1)} \sum_{j=1}^n [S_{ij} - S_{ij,fit}]^2
 \end{aligned}$$

Diese Wichtung der Datensätze ist über die Ermittlung der Standardabweichung σ_i immer noch leicht fehlerbehaftet, so daß χ^2 bei gleicher Fitqualität für verschiedene Datensätze zwischen 0.5 und 2 schwankt. Der Parameter χ^2 kann somit nur zur Beurteilung der Verbesserung der Fitqualität eines Datensatzes, aber nicht zum Vergleich der Fitqualität verschiedener Datensätze genutzt werden. Deshalb wird für die Absorptionsdaten auf die Angabe des χ^2 Wertes verzichtet.

- Datenanpassungen im langen Zeitbereich ohne Entfaltung erfordern keine äquidistanten Datenpunkte, so daß alle Absorptionstransienten sowohl im Zeitbereich von -100 ps bis 300 ps mit Entfaltung als auch im Zeitbereich von 50 ps bis 3 ns global analysiert wurden.
- Um eine Datenanalyse über den gesamten Zeitbereich mit Entfaltung durchführen zu können, müssen die Datenpunkte äquidistant sein. Dafür wurden künstlich Datenpunkte im Abstand von 2 ps im Zeitbereich ab 300 ps eingefügt. Um eine artifizielle Verbesserung

der Datenpunkte zu verhindern, wie es bei Einfügen der Datenpunkte durch Spline Routinen o. Ä. der Fall wäre, wurden die künstlichen Datenpunkte dem am nächsten liegenden Meßpunkt gleichgesetzt. Der Datensatz im längeren Zeitbereich hat damit den Charakter einer Stufenfunktion. Die Begrenzung der Auswertesoftware auf maximal 1000 Punkte pro Kinetik ermöglicht damit eine Auswertung der Daten mit Entfaltung von $-0.1 - 1.9$ ns.

- Die Normierung der aus der Globalanalyse der Zerfälle ermittelten Amplituden wäre nicht notwendig, wenn alle Experimente unter vollständig reproduzierbaren Meßbedingungen stattfinden würden. Da aber insbesondere die Reproduzierbarkeit der Probenkonzentration und der Anregungsintensität nicht vollständig gewährleistet ist, werden für jeden Probenansatz Vergleichsmessungen an einer Referenzwellenlänge⁸⁹ durchgeführt und darüber kalibriert.

Für die Targetanalyse der Daten sind weiterhin Beschränkungen in der maximalen Anzahl der Parameter pro Datensatz zu beachten. Dies führt dazu, daß kompliziertere Modellannahmen wie ein vierstufiges Relaxationsmodell mit Entfaltung der Kinetik nicht mehr zu bearbeiten sind. Deshalb wurden für die Modellierung der Fluoreszenzzerfallsspektren, die auf Grund ihres Signal/Rausch Verhältnisses komplexer als die Absorptionsspektren sind, erst synthetische Kurven über die Anpassung der Daten mit einer Summe von Exponentialfunktionen erzeugt und an diesen die verschiedenen Modelle getestet. Dies stellt keine reine Targetanalyse mehr dar. Insbesondere der Vorteil einer realistischen Fehlerabschätzung über die Methode der *exhaustive search analysis* wird eingeübt.

⁸⁹ Hier 680 nm.

III.5 Weitere verwendete Untersuchungsmethoden

Q_A Reduktion: Die Konzentration von Zentren mit funktionstüchtigem Q_A wurde über die Reduktion von Q_A mit der Blitzphotolyse ($\Delta\epsilon$ (320 nm) = $1.3 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [Van Gorkom (1974)]) bei sättigender Anregung in Anwesenheit von 1 mM FeCy und 100 μM DCBQ bestimmt. Die verwendete Meßapparatur ist in Gerken *et al.* (1989) beschrieben.

Sauerstoffentwicklung: Die Konzentration von sauerstoffaktiven PS II Zentren wurde über die Sauerstoffentwicklung bei Anregung mit sättigenden *single-turnover* Blitzen mit Hilfe einer Clarkelektrode gemessen. Dabei beträgt der Sauerstoffumsatz $\frac{1}{4} \text{ O}_2$ pro Blitz pro Kernkomplex. Eine Beschreibung der Meßapparatur findet sich in Derr (1996).

P700-Gehalt: Die Probe wird durch Lichtblitze sättigend angeregt und die Ausbleichung von P700 mit $\Delta\epsilon$ (702 nm) = $6.4 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ im ms Zeitbereich unter Anwesenheit von 5 mM Ascorbat und 5 μM PMS zur Rereduktion von P700⁺ gemessen. Methode und Apparatur sind in [Flemming (1996)] beschrieben.

³P680 Detektion: Die Tripletquantenausbeute von P680 wurde mit Hilfe der Blitzphotolyse im NIR im μs Zeitbereich mit sättigenden Anregungsblitzen gemessen ($\Delta\epsilon=8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 750 nm für ³P680 [Mathis und Sétif (1981)]); für eine Charakterisierung der Anlage siehe [Hillmann und Schlodder (1995a)].

Alle in diesem Abschnitt aufgeführten Untersuchungsmethoden konnten in der AG Schlodder des Max-Volmer-Institut der TU Berlin durchgeführt werden.